

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**INMUNOTERAPIA AUTÓLOGA CON CÉLULAS DENDRÍTICAS EN MODELOS  
CANINOS CON TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE**

Por

**M.V. Z. YAREELLYS RAMOS ZAYAS**

Como Requisito Parcial para Obtener el Grado de  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

Mayo de 2015

**“Inmunoterapia Autóloga con Células Dendríticas en Modelos  
Caninos con Tumor Venéreo Transmisible”**

**Comité de Tesis**



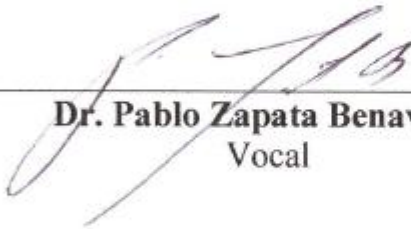
---

**Dra. Cristina Rodríguez Padilla**  
Presidente



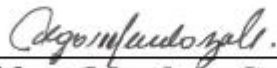
---

**Dr. Moisés A. Franco Molina**  
Secretario



---

**Dr. Pablo Zapata Benavides**  
Vocal



---

**Dr. Edgar Mendoza Gamboa**  
Vocal



---

**Dr. Reyes S. Tamez Guerra**  
Vocal



**El presente trabajo fue desarrollado en el Centro Antirrábico de Guadalupe, Nuevo León y en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Cristina Rodríguez Padilla.**

# TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA.....	iii
LISTA DE TABLAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Cáncer.....	3
2.2 Tumor venéreo transmisible.....	4
2.2.1 Etiología.....	4
2.2.2 Aspectos clínicos e histológicos.....	5
2.2.3 Diagnóstico.....	6
2.2.4 Tratamiento.....	6
2.2.5 Inmunología del tumor venéreo transmisible.....	7
2.3 Inmunoterapia.....	9
2.4 Células dendríticas.....	11
2.5 Inmunoterapia con células dendríticas.....	14
3. JUSTIFICACIÓN.....	17

4. HIPÓTESIS.....	18
5. OBJETIVOS.....	19
5.1 Objetivo General.....	19
5.2 Objetivos Particulares.....	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
6.1 Biopsia primaria del tumor venéreo transmisible.....	20
6.2 Disgregación y cultivo de las células del tumor venéreo transmisible para la inoculación de nuestra paciente cero.....	21
6.3 Implantación de las células del tumor venéreo transmisible en nuestros pacientes.....	22
6.4 Preparación del extracto tumoral total del tumor venéreo transmisible con 1-butanol y colchicina .....	22
6.5 Diseño experimental.....	24
6.6 Preparación y mantenimiento de las alícuotas de citocinas recombinantes caninas para la diferenciación celular .....	24
6.7 Protocolo de aislamiento de células mononucleares de sangre periférica y diferenciación a células dendríticas .....	26
6.8 Análisis fenotípico de las células dendríticas obtenidas a partir de monocitos de sangre periférica.....	29
6.9 Ensayo de fagocitosis de células dendríticas inmaduras obtenidas a partir de monocitos de sangre periférica .....	30
6.10 Preparación de la vacuna de células dendríticas autólogas contra el tumor venéreo transmisible.....	31
6.11 Aplicación de la inmunoterapia autóloga con células dendríticas específicas para el tumor venéreo transmisible.....	32
6.12 Evaluación de la inmunoterapia autóloga con células dendríticas, sus efectos secundarios y tamaño tumoral .....	33
6.13 Análisis de las poblaciones de linfocitos en sangre periférica.....	33

6.14 Determinación de los niveles de IFN- $\gamma$ en suero sanguíneo por ELISA.....	34
6.15 Evaluación histológica del tumor venéreo transmisible en pacientes tratados con inmunoterapia autóloga con células dendríticas específicas del tumor .....	34
6.16 Evaluación de la capacidad inmunológica del extracto tumoral total del tumor venéreo transmisible como método de prevención <i>in vivo</i> .....	35
6.17 Análisis estadístico.....	35
7. RESULTADOS.....	36
7.1 Cultivo primario de células del tumor venéreo transmisible.....	36
7.2 Inoculación, desarrollo y crecimiento tumoral en los modelos caninos .....	37
7.3 Diferenciación y fenotipificación de las células dendríticas específicas del tumor venéreo transmisible .....	38
7.4 Ensayo de fagocitosis con FITC-Dextran en células dendríticas inmaduras .....	41
7.5 Evaluación de la inmunoterapia autóloga con células dendríticas.....	41
7.6 Evaluación de las poblaciones de linfocitos en sangre periférica por citometría de flujo.....	44
7.7 Determinación de los niveles IFN- $\gamma$ en sangre por ELISA .....	45
7.8 Evaluación de los cambios histológicos en el tumor durante la inmunoterapia con células dendríticas autólogas.....	46
7.9 Evaluación de la capacidad inmunológica del extracto tumoral total del tumor venéreo transmisible como método de prevención <i>in vivo</i> .....	47
8. DISCUSION.....	49
9. CONCLUSIONES.....	55
10. PERSPECTIVAS.....	56

11. BIBLIOGRAFÍA.....	57
12. RESUMEN BIOGRÁFICO.....	61

## AGRADECIMIENTOS

### ***A mi mamá, papá y hermana***

*A mi ángel que me cuida y protege desde el cielo, mi mamá Wanda Zayas López, la mujer que me enseñó que todo en la vida es posible, solo tienes que luchar por ello y creer en ti y que las cosas más simples y valiosas de la vida son las más sencillas. A mi papá, Armando Ramos Negrón, el hombre más importante en mi vida, mi mejor amigo y mi ejemplo a seguir, el que ha estado a mi lado en cada paso de mi vida dándome lo mejor de él en todo momento. A ti Yannerys, por ser mi amiga, confidente, por siempre creer en mí y por darme el regalo más lindo que me han dado en mi vida, a Zoe. Gracias por ser siempre mi apoyo incondicional, porque en momentos de grandes decisiones han estado a mi lado y han confiado siempre en mí. Los amo con todo mi corazón, besitos y abrazos.*

### ***A mis Tías y Primos***

*Tití Wilma, Tití Cuca, Titi Tati, Tío Luis, Coralys, Wanda, Luis A., José M., Lee Marie, Arnaldo, Leslie, gracias por todo su amor y por siempre estar para mí cuando más los he necesitado, por que la distancia no los ha alejado de mí, al contrario, los amo mucho, besitos y abrazos.*

### ***A ti Nelson y a tu Hermosa Familia***

*Nelson gracias por tu apoyo a cada momento en las buenas y en las malas, por ser mi amigo y mi pareja, al cual admiro con todo mi corazón, por hacerme reír y enseñarme tantas cosas de la vida. A Mamá Charo y Papá Rubén por quererme como una hija más, por su amor, sus comiditas y por brindarme un hogar único. A ti Rubén e Ivonne, por sus detalles y toda su ayuda para este trabajo y por tener unas grandiosas niñas que alegran mis días. A ti Charo, Claudia, Jorge y Lothar, por su amistad, por su amor, por siempre preguntar cómo iba mi trabajo, por sus buenos deseos, por su apoyo, por sus porras y por brindarme una familia la cual siempre llevaré en mi corazón, los amo mucho, besitos y abrazos.*

### ***A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla***

*Jefa del Departamento de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, directora de tesis de este trabajo, le agradezco todo su apoyo incondicional y confianza, por sus consejos, sus conocimientos, su cariño, su tiempo, por ser una mujer admirable en todas las facetas de la vida y por sus abrazos de fortaleza, besitos y abrazos, que papito Dios me la cuide y bendiga siempre con mucha salud y amor.*

### ***Al Dr. Moisés Armides Franco Molina (P<sup>2</sup>)***

*Por las vueltas que da la vida y tener el privilegio de que aquel que me hizo tantas preguntas en mi entrevista fuera con quien trabajaría en mi Tesis. Gracias AMIGO por creer en mí, por tu tiempo, tus conocimientos, tus consejos, tus bromas y por todo tu apoyo en las buenas y en las malas. Por abrirme las puertas de tu laboratorio, por la confianza que depositaste en mí desde el día en que llegué y que ha permanecido*



*constante hasta el día de hoy, muchas gracias, te quiero y admiro mucho, besitos y abrazos.*

***A mi comité de Tesis***

*A mi Amigo Incondicional, el Dr. Edgar Mendoza Gamboa, mi consejero, mi cómplice, mi ejemplo a seguir, gracias por tu linda amistad, por tu gran disposición y ayuda brindada durante el desarrollo de mi proyecto y tus importantes observaciones en la revisión de mi Tesis, al Dr. Pablo Zapata Benavides, por su colaboración y apoyo en aspectos técnicos para el mejoramiento de mi trabajo y al Dr. Reyes Tamez Guerra por todo su apoyo, los quiero mucho, besitos y abrazos.*

***Al Laboratorio de Inmunología y Virología (LIV) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL***

*Doctores, profesores, intendentes, compañeros de los demás laboratorios, secretarias y todo personal de LIV. Gracias por su trato, por siempre tener una sonrisa para mí y por toda su ayuda, por el apoyo económico y de infraestructura, por ser parte esencial de este trabajo, muchas gracias, los quiero mucho, besitos y abrazos.*

***A mis Compañeros del Laboratorio 6 (El Mejor del LIV)***

*Erika, Crystel, Faby, Carmen, Mariel, Fernanda, Edgar, Luis, Humberto, Rilque y Oscar, por su paciencia, por compartir sus conocimientos conmigo y siempre estar ahí para mí en las buenas y en las malas, con risas y con lágrimas y ser parte de mi Familia, los quiero mucho amigos, besitos y abrazos.*

***A mis Compañeros de Maestría***

*Claudia, Talyha, Ivón, Mariela, Felipe, Carlos y Alex, por su linda amistad y apoyo durante todo mi trabajo, por acogerme como una más de ustedes cuando recién entramos, son mi Familia, les deseo lo mejor siempre, uno para todos y todos para uno, los quiero mucho, besitos y abrazos.*

***A mi Segunda Familia Mexicana***

*Dayra, Adriana, Mafer, Yahmely, Zahela, Carlos, Diego, Ricky, Abraham, Wicho, Gera, César y Cobos, por tener el privilegio de conocerlos desde hace años y poder llamarlos Mi Familia, por ser mis colegas, mis amigos del alma, por siempre estar para mí en todo momento, por creer en mí y nunca dejarme sola, los amo con todo mi corazón, besitos y abrazos.*

***A mis Amigas del Alma***

*Lourdes, Giovana, Vimary y Nilsa, gracias porque a pesar de la distancia siempre hemos estado unidas. Gracias por todos estos años de amistad, sus detalles, por nunca dejarme sola y por todo su amor, las amo mucho, besitos y abrazos.*

***A CONACYT***

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios durante estos dos años.*

## **DEDICATORIA**

*Este trabajo se lo dedico a papito Dios y a la Virgencita, por ser los guías de mi vida, por mostrarme lo valioso de las cosas con pequeños detalles y demostrarme a cada paso que doy que no estoy sola porque ustedes están a mi lado.*

*A mi familia, las personas más importantes en mi vida y a las cuales amo con todo mi corazón y son mi razón de ser, las cuales día a día dan desinteresadamente lo mejor de ellos para impulsar mis sueños y ver cumplidas mis metas, que se desvelaron a mi lado, que se estresaron conmigo, que se preocuparon por mi, que con una llamada bastaba para que sintiera de nuevo la motivación de comenzar con mas ánimo el día siguiente, que el estar lejos de mi hogar nunca significó un desafío para su amor, cariño y su incondicionalidad, palabras siempre me faltan cuando tengo que agradecer al pilar de mi vida y la razón de mis triunfos... Mi Hermosa Familia, esto es por Ustedes.*

*“El ayer es historia, el mañana un misterio, el día de hoy es un regalo, por eso le llaman presente”*

**Eleonor Roosevelt**

## LISTA DE TABLAS

CONTENIDO	PÁGINA
<b>Tabla 1.</b> Grupos Experimentales.....	22

## LISTA DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁGINA
<b>Figura 1.</b> Modelo de evasión del tumor venéreo transmisible al sistema inmune, fase progresiva.....	8
<b>Figura 2.</b> Modelo de evasión del tumor venéreo transmisible al sistema inmune, fase regresiva.....	8
<b>Figura 3.</b> Biopsia del tumor venéreo transmisible.....	20
<b>Figura 4.</b> Implantación y desarrollo del tumor venéreo transmisible a nuestros grupos experimentales. ....	21
<b>Figura 5.</b> Preparación del extracto tumoral total del tumor venéreo transmisible con 1-butanol y colchicina.....	23
<b>Figura 6.</b> Diseño experimental.....	24
<b>Figura 7.</b> Protocolo de diferenciación de monocitos a células dendríticas en 48 horas. ....	29
<b>Figura 8.</b> Ensayo de fagocitosis con FITC-Dextran.....	31
<b>Figura 9.</b> Preparación de la vacuna de células dendríticas autólogas contra el tumor venéreo transmisible.....	32
<b>Figura 10.</b> Protocolo de aplicación de la inmunoterapia autóloga con células dendríticas.....	33
<b>Figura 11.</b> Protocolo de aplicación del extracto tumoral total del tumor venéreo transmisible.....	35
<b>Figura 12.</b> Disgregación y cultivo de las células del tumor venéreo transmisible .....	36
<b>Figura 13.</b> Desarrollo de la implantación del tumor venéreo transmisible.....	37
<b>Figura 14.</b> Proceso de diferenciación de monocitos a células dendríticas.....	39
<b>Figura 15.</b> Fenotipificación de monocitos por citometría de flujo.....	40
<b>Figura 16.</b> Fenotipificación de células dendríticas por citometría de flujo.....	40

<b>Figura 17.</b> Ensayo de fagocitosis con FITC-Dextran por citometría de flujo.....	41
<b>Figura 18.</b> Evaluación de los efectos secundarios de la inmunoterapia autóloga con células dendríticas.....	42
<b>Figura 19.</b> Evolución del tamaño tumoral durante la inmunoterapia.....	43
<b>Figura 20.</b> Comparación de dos pacientes antes y después de la inmunoterapia autóloga con células dendríticas específicas del TVT.....	43
<b>Figura 21.</b> Caso representativo del grupo experimental que recibió la inmunoterapia autóloga con células dendríticas específicas del TVT.....	44
<b>Figura 22.</b> Evaluación de las poblaciones de linfocitos en sangre periférica por citometría de flujo.....	45
<b>Figura 23.</b> Determinación de los niveles de IFN- $\gamma$ en el suero sanguíneo por ELISA.....	46
<b>Figura 24.</b> Cambios histológicos antes y después de la inmunoterapia autóloga con células dendríticas.....	47
<b>Figura 25.</b> Prueba de Bradford para el extracto tumoral total del tumor venéreo transmisible.....	47
<b>Figura 26.</b> Evaluación de la capacidad inmunológica del extracto tumoral total de tumor venéreo transmisible como método de prevención <i>in vivo</i> .....	48

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
C	Celsius
CD	Célula dendrítica
cADN	Ácido desoxirribonucleico complementario
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
cm	Centímetros
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CPA	Célula presentadora de antígeno
DLA II	Antígeno leucocitario de perro II
DMEM	Medio dulbecco's eagle's modificado
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
ETT	Extracto tumoral total
FEC	Factores estimulantes de colonias
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
HLA	Antígeno leucocitario humano
IFN- $\gamma$	Interferón-gamma
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IM	Intramuscular

IV	Intravenoso
kg	Kilogramos
KLH	Key-hole limpet hemocyanin
m <sup>2</sup>	Metros al cuadrado
mg	Miligramos
mL	Mililitros
NK	Asesinas naturales
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
RPMI	Medio Roswell park memorial institute
SC	Subcutáneo
SFB	Suero fetal bovino
TCR	Receptor linfocito T
TGF-β1	Factor de crecimiento transformante beta 1
Th-1	Linfocito T cooperador tipo 1
Th-2	Linfocito T cooperador tipo 2
TLR	Receptores tipo Toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TVT	Tumor venéreo transmisible
Tx	Tratamiento
U	Unidades
μg	Microgramos
μL	Microlitros

## RESUMEN

La inmunoterapia autóloga utiliza células del mismo cuerpo para estimular y restaurar las defensas naturales del sistema inmunológico. Algunas de las células que han sido utilizado en años recientes son: linfocitos infiltrantes de tumor, linfocitos T citotóxicos, células asesinas activadas por linfocinas y células dendríticas (CD). Las CD son células especializadas y su función es el capturar, procesar y presentar antígenos a los linfocitos para iniciar una respuesta inmune. El tumor venéreo transmisible (TVT), también conocido como sarcoma infeccioso o tumor de Sticker, es un cáncer transmisible en perros que afecta mayormente los genitales externos y se transmite durante el coito. En este trabajo se implementó por primera vez un modelo de TVT en el órgano genital (vagina) de los pacientes y se les administró la inmunoterapia autóloga con CD específicas contra el tumor. Para estudiar esta terapia se utilizaron tres grupos experimentales: el tumor sin tratamiento, el tumor tratado con sangre completa autóloga, y el tumor tratado con CD autólogas específicas para el TVT. Por último se evaluó la capacidad inmunológica del extracto tumoral total (ETT) del tumor como método de prevención *in vivo*. Para el tratamiento autólogo con las CD, se esperó que el tumor midiese 3cm, se realizó un cultivo primario de las células de TVT y se les extrajo el 4% de su peso corporal de sangre a los pacientes para realizar una diferenciación de los monocitos a CD. Para evaluar el efecto de la inmunoterapia autóloga con CD se observaron los efectos secundarios, el tamaño tumoral, las poblaciones de linfocitos, los niveles de IFN- $\gamma$  en sangre y los linfocitos infiltrantes de tumor por histopatología. Los monocitos se diferenciaron a CD y se les realizó un análisis fenotípico mediante citometría de flujo. Los monocitos mostraron una expresión de CD14<sup>+</sup> de 80.1%, CD80<sup>+</sup> de 15.6%, CD83<sup>+</sup> de 0.4% y un DLA II de 1.8%. En las CD se obtuvo una expresión de 8.7% para CD14<sup>+</sup>, 80.3% para CD80<sup>+</sup>, 76.4% para CD83<sup>+</sup> y 86.5% para DLA II y 62% en la prueba de fagocitosis. La terapia no mostró ningún efecto secundario en nuestro grupo experimental y hubo una regresión tumoral del 100% para la semana doce. Se encontró un aumento de expresión celular en sangre de CD4<sup>+</sup> de 29%, de CD8<sup>+</sup> de 34% y de IFN- $\gamma$  de 120 pg/mL. Nuestros resultados demuestran que la inmunoterapia autóloga con CD específicas inducen una regresión del TVT en caninos.



## ABSTRACT

Autologous immunotherapy uses the body's own cells to stimulate and restore the natural defenses of the immune system. Some of the cells that have been used by various researchers are: tumor infiltrating lymphocytes, cytotoxic T lymphocytes, lymphocytes activated killer cells and dendritic cells (DC). DCs are specialized cells of the immune system and its role is to capture, process and present antigens to lymphocytes to initiate an immune response. The transmissible venereal tumor (TVT), also known as infectious sarcoma or Sticker tumor, is a transmissible cancer in dogs that mostly affects the external genitalia and is transmitted during sexual coition. In this work we was the first implemented the TVT model in the genital organ (vagina) of the patients and DC specific autologous for the tumor were used for immunotherapy in canines with TVT. To study the autologous immunotherapy four experimental groups were used: the untreated tumor; the tumor treated with complete autologous blood; the tumor treated with specific autologous DCs to TVT and finally the total tumor extract of TVT for immunization as a preventive method. For the autologous treatment with the DC, it was expected that the tumor measure 3cm, a primary culture of TVT cells was performed and was extracted 4% of their body weight of blood of the patients to differentiate monocytes into DC. To evaluate the effect of the autologous immunotherapy with DC side effects were observed, tumor size, populations of lymphocytes and IFN- $\gamma$  levels in blood serum and tumor infiltrating lymphocytes by histopathology. Monocytes were differentiated into DC and underwent a phenotypic analysis by flow cytometry. Monocytes showed an expression of 80.1% for CD14<sup>+</sup>, 15.6% for CD80<sup>+</sup>, 0.4% for CD83<sup>+</sup> and 1.8% for DLA II. In DC 8.7% for CD14<sup>+</sup>, 80.3% for CD80<sup>+</sup>, 76.4% for CD83<sup>+</sup> and 86.5% for DLA II and in phagocytosis test 62% was obtained. No side effect was showed in our experimental group for our therapy and the tumor regression was of 100% for twelve week. An increase of 29% of CD4<sup>+</sup> and 34% of CD8<sup>+</sup> cell expression and IFN- $\gamma$  level of 120 pg/mL was found. These results shown that the specific autologous DC immunotherapy induce regression of the TVT in dogs.

# 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer se origina cuando las células en alguna parte del cuerpo comienzan a crecer de manera descontrolada debido a varias mutaciones en su ácido desoxirribonucleico (ADN). Existen muchos tipos de cáncer, pero todos comienzan debido al crecimiento sin control de células anormales. Se conocen más de 200 diferentes tipos de cáncer, los más comunes son los de la piel, pulmón, mama y colorrectal. A nivel mundial el cáncer es la principal causa de muerte en los países desarrollados. Las estimaciones para el 2020 apuntan a 18.7 millones de casos de cáncer y 8.6 millones de muertes por cáncer en todo el mundo. A pesar de las mejoras en el tratamiento de diversos cánceres comunes, muchas terapias siguen teniendo muchos efectos secundarios para el paciente (Dingli y Nowak, 2010).

La cuarta terapia del cáncer es la inmunoterapia, esta es una nueva alternativa para el tratamiento del cáncer, utilizándose en etapas tempranas de la enfermedad o incluso en cáncer avanzado con metástasis, en los últimos años diversos científicos han publicado resultados prometedores sobre el uso de la inmunoterapia en pacientes humanos con cáncer y también el establecimiento de protocolos de inmunoterapia como tratamiento antitumoral en diferentes modelos con enfermedad cancerígena (Emens y Jaffee, 2011). Estudios recientes de vacunas basadas en células tumorales constituyen la gran promesa para el tratamiento del cáncer. Una estrategia que se está utilizando es el uso de vacunas con CD, que tienen la maquinaria completa para el procesamiento y presentación eficiente del antígeno junto con moléculas co-estimulador.

Las células dendríticas presentan una capacidad única de tomar y procesar antígenos, de movilizarse hacia tejidos linfoides secundarios y de activar tanto linfocitos T cooperadores como linfocitos T citotóxicos. La preparación de las vacunas basadas en células dendríticas implica el co-cultivo de éstas con antígenos del tumor, péptidos antigénicos, ácido desoxirribonucleico complementario (cADN) o el ácido ribonucleico (ARN) aislado de células tumorales. La identidad de los antígenos tumorales o los epítomos del péptido específicos del tumor siguen siendo desconocidos para la mayoría

de los tumores. Por ello, los estudios recientes se han centrado en desarrollar métodos más eficaces para la obtención de antígenos tumorales y su presentación a las células dendríticas (Gerold *et al.* 2009).

La inmunoterapia con CD ya se utiliza en clínicas y ha demostrado ser eficaz. El primer estudio clínico de una vacuna basada en células dendríticas fue descrito en 1996 para el linfoma de células B. Actualmente estas vacunas se están utilizando en ensayos clínicos para tratar el melanoma, el cáncer de mama, el mieloma múltiple, el linfoma no-Hodgkin, la leucemia linfática, el adenocarcinoma prostático, el cáncer de pulmón y el hepatocarcinoma. Los datos iniciales proporcionados por los estudios clínicos indican que la vacunación basada en CD puede inducir protección frente al desarrollo del tumor (Seton 2012).

El TVT se considera inusual en varios aspectos; primero, porque las células neoplásicas son genéticamente distintas a las del huésped, ya que contienen 59 cromosomas en lugar de los 78 naturalmente presentes en las células somáticas del perro y también porque es transmitido por la implantación de células neoplásicas. El TVT es notable, ya que es el único tumor que puede ser trasplantado dentro de individuos de la misma especie e incluso a miembros de la familia canina, tales como zorros, coyotes y lobos. En investigaciones recientes donde se emplearon varios marcadores genéticos, se concluyó que el agente infeccioso del TVT canino es la misma célula cancerosa y que el tumor es clonal en su origen (Ramírez *et al.* 2010). En ese trabajo se utilizaran CD autólogas como inmunoterapia en modelos caninos con TVT.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Cáncer

Los organismos vivos están compuestos por millones de células vivas. Las células normales crecen, se dividen formando nuevas células y mueren de manera ordenada. Durante los primeros años de vida de una persona, las células normales se dividen más rápidamente para permitir el crecimiento. Una vez que se llega a la edad adulta, la mayoría de las células sólo se dividen para remplazar las células desgastadas o las que están muriendo y para reparar lesiones.

El cáncer se origina cuando las células en alguna parte del cuerpo comienzan a crecer de manera descontrolada. Existen muchos tipos de cáncer, pero todos comienzan debido al crecimiento sin control de células anormales. En lugar de morir, las células cancerosas continúan creciendo y forman nuevas células anormales. Estas células pueden también invadir o propagarse a otros tejidos, algo que las células normales no pueden hacer. El hecho de que crezcan sin control e invadan otros tejidos es lo que hace que una célula sea cancerosa (Meza *et al.* 2006).

El proceso por el cual se produce el cáncer o carcinogénesis, es causado por mutaciones (puntual, translocación, amplificación, delección, y ganancia o pérdida de un cromosoma completo) en el material genético de las células. Las células se transforman en células cancerosas debido a una alteración en el ADN (Meza *et al.* 2006). El ADN se encuentra en cada célula y dirige todas sus actividades. En una célula normal, cuando se altera el ADN, la célula repara el daño o muere. Por el contrario, en las células cancerosas el ADN dañado no se repara y la célula no muere como debería. En lugar de esto, esta célula persiste en producir más células que el cuerpo no necesita. Todas estas células nuevas tendrán el mismo ADN dañado que tuvo la primera célula. Las personas pueden heredar un ADN dañado, pero la mayoría de las alteraciones del ADN son causadas por errores que ocurren durante la reproducción de una célula normal o por algún otro factor del ambiente. Algunas veces, la causa del daño al ADN es algo obvio,

como el fumar cigarrillos. No obstante, es frecuente que no se encuentre una causa clara. A nivel mundial el cáncer es la causa principal de muerte en los países desarrollados y la segunda causa principal de muerte en los países en desarrollo. Las estimaciones para 2020 apuntan a 18.7 millones de casos de cáncer y 8.6 millones de muertes por cáncer en todo el mundo (Dingli y Nowak, 2006).

## **2.2 Tumor venéreo transmisible**

El tumor venéreo transmisible, también conocido como sarcoma infeccioso, granuloma venéreo, linfosarcoma transmisible, condiloma canino o tumor de Sticker, es un tumor retículo endotelial de los perros, que mayormente afecta los genitales externos. Se transmite durante el coito. Ocurre en animales sexualmente maduros, pudiendo también afectar a lobos y coyotes. Este tumor posee 59 (57-64) cromosomas en contraste con los 78 normales de la especie (Murchison 2009). El TVT tiene una distribución en los cinco continentes, es una neoplasia común en zonas tropicales y subtropicales. El tumor transmisible y su fenotipo fue descrito en 1876 por Nowinsky, posteriormente se convirtió en un modelo popular para los biólogos del cáncer. Sin embargo, a pesar de 130 años de investigación del TVT, muchas características de este cáncer transmisible siguen siendo poco conocidas (De La Sota *et al.* 2000).

### **2.2.1 Etiología**

Nowinsky demostró que el tumor podía ser trasplantado de un huésped susceptible a otro por inoculación de células tumorales. El hallazgo de inclusiones citoplasmáticas en las células tumorales hizo que esta neoplasia sea atribuida a un agente viral por algunos autores (De La Sota *et al.* 2000). La exfoliación y trasplante de células neoplásicas es la vía principal de transmisión en mucosa genital, nasal u oral, durante el apareamiento, mordedura, rascado o lamido de los genitales afectados. La implantación del tumor se ve facilitada por la presencia de cualquier lesión en la mucosa o por pérdida de su integridad (Claudio *et al.* 2006).

El tumor aparece 50 a 60 días después de la implantación. El TVT puede crecer lentamente o ser rápidamente invasivo. Se ha demostrado que el sistema inmunológico del huésped tiene un papel importante inhibiendo el crecimiento del tumor y las metástasis. En perros jóvenes o con inmunidad suprimida, puede haber tendencia a las metástasis. No obstante, en general, las metástasis ocurren en menos de 5-17% de los casos (Mukaratirwaa y Gruys, 2003). Estas han sido descritas en tejido subcutáneo, piel, nódulos linfáticos, ojos, amígdalas, hígado, bazo, mucosa oral, hipófisis, peritoneo, cerebro y huesos. Las lesiones extragenitales pueden ocurrir solas o asociadas con la localización genital (Marchal 1997).

Se han hallado distintos tipos de células en las diferentes fases de crecimiento tumoral. En el caso de tumores en fase de crecimiento progresivo, las células son redondas y con microvellosidades, mientras que cuando están en la etapa de regresión las células presentan forma fusiforme (Pérez *et al.* 1998). Por otra parte, los tumores que están en fase de regresión tienen un elevado número de linfocitos T que segregan interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) e interleucina-6 (IL-6), sustancias implicadas en la regresión tumoral (Ya-Wen 2002).

### **2.2.2 Aspectos clínicos e histológicos**

Inicialmente se observan pequeños nódulos rosas o rojos, de 1-3 mm de diámetro siendo las lesiones superficialmente dermoepidérmicas o pedunculadas. Los nódulos múltiples se unen formando una gran red hemorrágica de aspecto parecido a una coliflor. Estas masas pueden tener de 5 a 7 cm de diámetro, progresando a más profundidad en la mucosa, con lesiones subcutáneas multilobulares que pueden exceder los 10-15 cm. El examen citológico muestra células típicamente redondeadas a poliédricas, con un delgado citoplasma eosinofílico vacuolado y un núcleo redondo hipercromático con 1-2 nucléolos y un número moderado de figuras mitóticas (Pérez *et al.* 1998).

Mucho se ha aprendido sobre el comportamiento de crecimiento de las células de TVT en estudios de trasplantaciones experimentales. Los tumores de TVT trasplantados

experimentalmente tienen 3 fases diferentes de crecimiento; progresiva, estable y regresiva. Por el contrario, el TVT en la forma natural aun no se comprende del todo. Se ha identificado una fase inicial de progresión y una de estabilidad, pero la regresión espontanea no ha sido bien documentada por el momento. La metástasis es frecuentemente observada en la forma natural (Harmelin *et al.* 2002).

### **2.2.3 Diagnóstico**

Los perros con localización genital tienen una descarga vulvar o prepucial hemorrágica. En los machos las lesiones usualmente se localizan cranealmente en el pene, mucosa prepucial o glande. En las perras el tumor tiene macroscópicamente un aspecto similar y puede localizarse en el vestíbulo y/o canal vaginal proyectándose a través de los labios vulvares y frecuentemente causando una deformación de la región perianal. La descarga puede a veces atraer machos y ser confundida por los dueños con el estro (Ramírez *et al.* 2010). El diagnóstico definitivo se logra por medio del examen físico, hallazgos citológicos de células exfoliadas obtenidas por medio de hisopados, raspados o improntas del tumor y biopsias de histopatología (Pérez *et al.* 1998).

### **2.2.4 Tratamiento**

Se utiliza cirugía y quimioterapia para el tratamiento del TVT (Mukaratirwaa y Gruys, 2003). Sin embargo el sulfato de vincristina es el tratamiento más efectivo y mejores resultados. La vincristina se indica semanalmente en dosis de 0.5-0.7 mg/m<sup>2</sup> de área de superficie del cuerpo o 0.025 mg/kg, intravenoso (IV). La involución de las lesiones es gradual, aunque particularmente significativa al comienzo del tratamiento. La remisión completa lleva de 2 a 8 inyecciones y ocurre en más del 90% de los casos tratados (De La Sota *et al.* 2000).

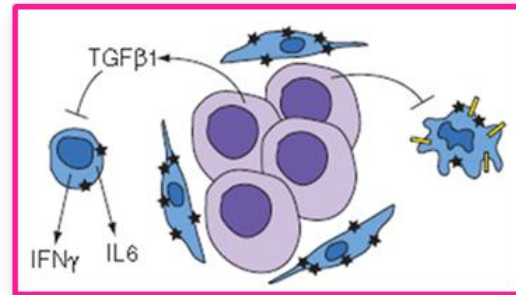
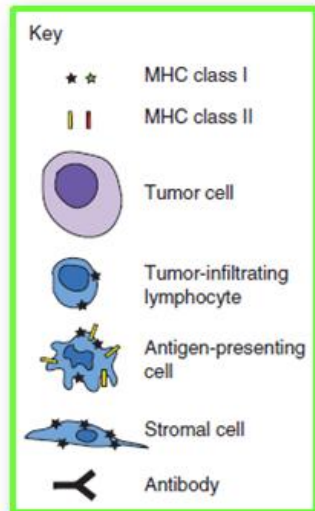
### 2.2.5 Inmunología del tumor venéreo transmisible

Una característica del TVT durante la fase progresiva es que no expresan antígenos de histocompatibilidad (CMH) de tipo I y II, aunque ha habido informes contradictorios que mencionan que si hay expresión pero en bajas concentraciones, las cuales no son detectadas por el sistema inmune. Curiosamente, durante la fase de regresión se incrementan el número de células de TVT que expresan antígenos de histocompatibilidad. La transición de la fase progresiva a la fase regresiva de TVT puede ser provocada por la inducción de la expresión de los antígenos del CMH causada por un incremento en la producción de citoquinas por los LIT (Murchison 2009).

Ya-Wen *et al.* (2002) encontraron que las células de TVT producen factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFB-1) y demostraron que esta citocina inhibe la actividad de las células asesinas naturales (NK), así como la citotoxicidad de los linfocitos infiltrantes de tumor. Los efectos supresores de TGFB-1 sobre la actividad de las NK pueden ser contrarrestados por la citocina pro-inflamatoria IL-6, que es secretada por los linfocitos infiltrantes de tumor (Murchison 2009).

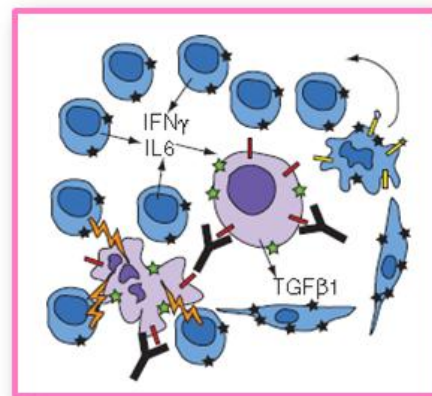
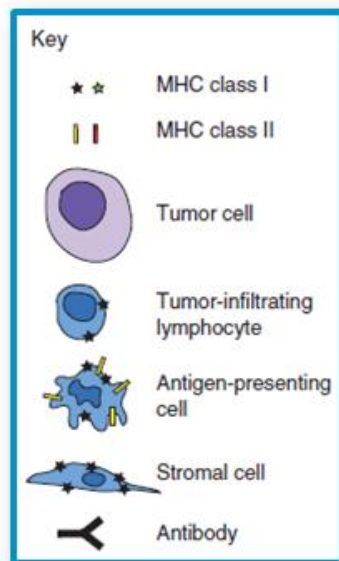
En resumen varios investigadores han propuesto este modelo de cómo el TVT evade el sistema inmune de su huésped. En la fase progresiva del TVT no se expresan antígenos del CMH en las células tumorales. Estas células a su vez secretan TGFB-1, una citocina que inhibe la actividad de las células NK, de las células presentadoras de antígenos y de los LIT. Una vez que se alcanza un nivel significativo de IL-6 (la cual es producida por los LIT) en el microambiente tumoral, hay un efecto represivo del TGFB-1 y los LIT comienzan la liberación de IFN- $\gamma$  e induzcan la expresión de los antígenos de histocompatibilidad en las células de TVT, provocando una respuesta inmune y por ende la regresión tumoral (**Figura 1 y 2**) (Murchison *et al.*, 2010 y Ya-Wen *et al.*, 2002).





Fase Progresiva TVT

**Figura 1. Modelo de evasión del tumor venéreo transmisible al sistema inmune, fase progresiva.** Durante la fase progresiva, las células tumorales no expresan CMH I y II, y el tumor segrega factor de crecimiento transformante B1 (TGFB-1), una citocina que inhibe la citotoxicidad de los linfocitos infiltrantes de tumor (incluyendo las células asesinas naturales NK). Las células tumorales también pueden inhibir algunos tipos de células presentadoras de antígenos. Los linfocitos infiltrantes de tumor están presentes en bajas cantidades (Murchison 2009).



Fase Regresiva TVT

**Figura 2. Modelo de evasión del tumor venéreo transmisible al sistema inmune, fase regresiva.** Durante la fase de regresión, los linfocitos infiltrantes de tumor aumentan en cantidad, su secreción de IFN- $\gamma$  y la interleucina-6 (IL-6) contrarrestan los efectos represivos de TGFB-1 derivados del tumor e induce la expresión de CMH I y II en las células tumorales. La expresión de CMH muestra al TVT como un aloinjerto y son rechazadas por ambos procesos citotóxicos, tanto por el dependiente e independiente de anticuerpos (Murchison 2009).

## 2.3 Inmunoterapia

La inmunoterapia ayuda a estimular las defensas naturales del organismo para eliminar células cancerígenas. Se utilizan diferentes tipos de células tales como: los LIT, linfocitos T citotóxicos, células asesinas activadas por linfocinas y células dendríticas las cuales ayudan a mejorar, identificar o restaurar la función del sistema inmunológico (Emens y Jaffee 2007). La preparación de vacunas basadas en células dendríticas, la administración sistémica de citocinas, la terapia con anticuerpos monoclonales y la expresión de moléculas inmunoestimuladoras en las células del tumor mediante tecnología de transferencia génica o transferencia de proteínas, constituyen estrategias inmunoterapéuticas que desencadenan respuestas inmunes antitumorales eficaces (Sagrario y Paloma 2011).

El uso de la inmunoterapia depende de la inducción de una respuesta inmune antitumoral específica. Numerosos estudios han demostrado que tanto la inmunidad innata como la adquirida son capaces de reconocer muchos antígenos del tumor y desencadenar una respuesta antitumoral frente a tumores en desarrollo. Estas respuestas antitumorales son mediadas sobre todo por los linfocitos T, con poca participación de anticuerpos. Sin embargo, las células tumorales, pobremente inmunogénicas, escapan de la inmunovigilancia haciendo al hospedero incapaz de producir una respuesta inmune adecuada, dirigida hacia la metástasis del tumor (Rescigno *et al.* 2007).

Hay cuatro tipos de inmunoterapia, estos son: interferones, interleucinas, anticuerpos monoclonales y vacunas (de manera preventiva o como tratamiento). Estos pueden utilizarse solos o combinados entre sí o bien junto con otros tratamientos contra el cáncer. 1. Los interferones son un grupo de tres proteínas liberadas por los leucocitos en respuesta a los microorganismos invasores, con la misión de mejorar la reacción del sistema inmunitario contra el cáncer (Emens y Jaffee 2007). El interferón alfa está aprobado para el tratamiento de algunos tipos de cáncer, como el melanoma y la leucemia mieloide crónica, pero se está estudiando su uso en otros cánceres (López *et al.* 2004). 2. Las interleucinas son proteínas que incrementan el crecimiento y la actividad

de las células inmunes del organismo. Hasta ahora se han identificado más de diez interleucinas, pero la IL-2 está aprobada como tratamiento contra el cáncer, sobre todo en los cánceres renales y melanomas que han tenido metástasis a otras partes del cuerpo (Rosenblatt 2008).

3. Los anticuerpos monoclonales se crean en el laboratorio fusionando dos tipos distintos de células. Se diseñan para atacar regiones específicas de la superficie de las células denominadas antígenos. Los antígenos ayudan a que el organismo identifique las células que son extrañas, como gérmenes o células cancerosas, y estimulan una respuesta inmunitaria (McLaughlin 2001). Los anticuerpos monoclonales se muestran prometedores como tratamiento del cáncer y como instrumento diagnóstico.

4. Las vacunas ayudan a que el organismo reconozca las células cancerosas y active el sistema inmunitario para que las destruya, hay varios tipos de vacunas contra el cáncer (Sondei 1989). Algunas de estas son: a. vacunas con células cancerosas que han sido destruidas con radiación para que no puedan producir tumores nuevos, b. vacunas que contienen antígenos producidos en el laboratorio diseñados para unirse a las células cancerosas, c. vacunas celulares, con células dendríticas. Las vacunas contra el cáncer se utilizan para ayudar a que el organismo destruya las células tumorales o evite que reaparezcan (John y Joanne 2004).

Las vacunas con células cancerosas irradiadas permiten la inducción de una respuesta inmune más policlonal mediante la presentación de una amplia gama de antígenos tumorales (Havranek *et al.* 2002). Un ejemplo es el desarrollo de GVAX, una vacuna basada en células enteras y genéticamente dirigidas a secretar factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF). GVAX ha demostrado que disminuye los niveles séricos del antígeno prostático específico (PSA, serina proteasa que se sobreexpresa en las células de los acinos y túbulos de la glándula prostática tumoral) en algunos pacientes en ensayos clínicos de fase I y II (Kaminski *et al.* 2003). Sin embargo, en los ensayos clínicos de fase III, comparando la eficacia clínica de la inmunoterapia GVAX combinada con Docetaxel, con la combinación Docetaxel más Prednisona, se encontró que había una incidencia mayor de muertes en el grupo de GVAX que en el grupo control de Docetaxel (Kaminski *et al.* 2003). Los estudios recientes de vacunas

basadas en células tumorales constituyen la gran promesa para el tratamiento del cáncer (Ross DS, Steele G. 1984).

Las vacunas con células dendríticas han demostrado ser eficaces. El primer estudio clínico de una vacuna basada en células dendríticas fue descrito en 1996 para el linfoma de células B. Actualmente, las vacunas basadas en células dendríticas se están utilizando en ensayos clínicos para tratar el melanoma, el cáncer de mama, gliomas, el mieloma múltiple, el linfoma Hodgkin, la leucemia linfática, el adenocarcinoma prostático, el cáncer de pulmón y el hepatocarcinoma (Hayes *et al.* 2001). Los datos iniciales proporcionados por los estudios clínicos indican que la vacunación basada en estas células puede inducir protección frente al desarrollo del tumor. Las células dendríticas presentan una capacidad única de tomar y procesar antígenos, de moverse hacia tejidos linfoides secundarios y de activar tanto linfocitos T cooperadores como linfocitos T citotóxicos (Gerold *et al.* 2010). La preparación de las vacunas basadas en células dendríticas implica la carga de éstas con antígenos del tumor, péptidos antigénicos, cADN o ARN aislado de células tumorales. La identidad de los antígenos tumorales o los epítomos del péptido específicos del tumor siguen siendo desconocidos para la mayoría de los tumores. Por ello, los estudios recientes se han centrado en desarrollar métodos más eficaces para la liberación de los antígenos tumorales a las células dendríticas (Karolina Palucka y Jacques Banchereau. 2012).

## **2.4 Células dendríticas**

Las CD son células especializadas del sistema inmunológico y su función es el capturar, procesar y presentar antígenos a los linfocitos T y B para iniciar una respuesta inmune. Las CD expresan entre 10 y 100 veces más moléculas del CMH que los macrófagos y los linfocitos B. La eficaz activación de los linfocitos T ( $CD4^+$  y  $CD8^+$ ) por parte de las CD necesita de dos señales consecutivas. La primera señal es la presentación antigénica vía CMH tipo II y I de las CD con los receptores de las células T y la segunda señal es la interacción con moléculas coestimuladoras presentes en las CD:

CD80 y CD83 con el receptor linfocitario CD28, y la familia TNF con los receptores linfocitarios R-TNF (Young *et al.* 2007).

Tras su activación, los linfocitos T vírgenes sufren una expansión clonal y una diferenciación a células efectoras secretoras de citocinas y células memoria. El tipo de respuesta consiguiente de los linfocitos T depende de varios factores, como la concentración antigénica en la CD, la afinidad del TCR por el CMH, la duración de la interacción de la CD con el linfocito T, el estado de maduración de la CD, y el tipo de estímulo responsable de la maduración de la CD58. La supervivencia a largo plazo de los linfocitos T y su diferenciación a células de memoria y efectoras requiere la interacción con CD maduras. La activación inducida por CD inmaduras es de más corta duración (Granados y Delgado 2008).

Los linfocitos CD4<sup>+</sup> pueden diferenciarse hacia linfocitos Th-1, que producen IFN- $\gamma$  y secundan una respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos, o hacia linfocitos Th-2, que producen IL-4, IL-5 e IL-13, e implican inmunidad humoral y disminución de la respuesta Th-1. El patrón de citocinas producido por la CD activada determinará la dirección de esta polarización; IL-12, IL-18 e IL-27 dirigen hacia Th-1, mientras que CCL17, CCL22 o la ausencia de IL-12 lo hacen hacia Th-2. A su vez, este patrón de citocinas está regulado por factores como el subtipo de CD, la localización anatómica de la CD o el tipo de estímulo madurador. Estos parámetros también controlan otras características de la respuesta de los linfocitos T, como la inducción de tolerancia o la recirculación (homing) de los linfocitos T (Seton 2012).

La cooperación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en el momento de la activación es necesaria para generar linfocitos T CD8<sup>+</sup> memoria. Se cree que esta interacción está mediada por la unión entre la molécula CD40 de la CD y su ligando en el linfocito CD4<sup>+</sup> activado. (Seton 2012). Además de su papel central en la activación de los linfocitos T, las CD interactúan directamente con células NK, células NKT y linfocitos B. Las CD maduras y CD inmaduras pueden activar e inducir la expansión de células NK por mecanismos no aclarados totalmente, aunque se han descrito algunas proteínas y factores solubles

implicados. Las CD activadas también inducen directamente la proliferación de linfocitos B, el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas y su diferenciación a células plasmáticas secretoras de anticuerpos; estas acciones las pueden llevar a cabo tanto de forma linfocito T-dependiente como linfocito T-independiente (Granados y Delgado 2008).

La capacidad de las CD para generar respuestas antitumorales *in vivo* ha sido documentada en modelos animales y en estudios clínicos humanos. La mayoría de los ensayos implican el aislamiento de CD, seguido de la carga con antígenos tumorales y la posterior infusión de estas CD portadoras de antígenos. Se han descrito un elevado número de antígenos tumorales susceptibles de ser utilizados en protocolos de inmunoterapia (Karolina y Jacques 2012).

La exposición al antígeno puede hacerse siguiendo diferentes estrategias. La más frecuente es la incubación de las CD con péptidos derivados de proteínas tumorales restringidos por CMH y con epítomos definidos para la estimulación de linfocitos T, principalmente  $CD8^+$ . Desde finales de la década de los 90 se han hecho ensayos utilizando péptidos derivados de antígenos tumorales como MART-1, MAGE-1, gp100, CEA, PSMA o HER2/neu, por citar algunos (Gerold *et al.* 2003). Este sistema tiene las ventajas de evitar procesos autoinmunes y el no requerimiento de células o tejido tumoral. Sus principales inconvenientes son la necesidad de conocer los epítomos tumorales y la posibilidad de aplicarla únicamente a los pacientes cuyo HLA sea el adecuado. Para evitar los mecanismos de escape tumoral, es frecuente el uso de varios péptidos simultáneamente, en lugar de un único péptido (Karolina y Jacques 2012).

## **2.5 Inmunoterapia con células dendríticas**

La inmunidad es resultado de una compleja interacción entre el sistema inmune innato (que es no específica del antígeno) y el sistema inmune adaptativo (que es específica de antígeno). Las células y moléculas del sistema inmune innato utilizan receptores no clonales de reconocimiento, incluyendo lectinas, receptores tipo Toll

(TLRs), receptores tipo NOD (NLRs) y helicasas. Las células B y las células T del sistema inmune adaptativo utilizan receptores clonales que reconocen antígenos, o sus péptidos derivados, de una manera específica (Gerold *et al.* 2003).

En 2011, el Premio Nobel de Medicina o Fisiología fue concedido por el descubrimiento de sensores moleculares y celulares de microbios. Jules Hoffman y Bruce Beutler recibieron el premio por sus contribuciones al descubrimiento de los TLR en la década de 1990. Ralph Steinman recibió el premio por el descubrimiento en 1973 de las CD, un tipo de células raras que son los sensores celulares claves para los microbios. Las CD están vinculadas a su entorno a través de una gran cantidad de sensores moleculares que les permiten capturar microbios invasores y transmitir la información resultante a los linfocitos. Por lo tanto, las CD constituyen un vínculo esencial entre la respuesta inmune innata y adaptativa (Young *et al.* 2007).

Las estrategias de vacunación que utilizan las CD se han desarrollado debido a las características especiales de estas células en la coordinación de la respuesta inmune innata y adaptativa. El objetivo de la vacunación con CD es inducir células T efectoras específicas de tumores que pueden reducir la masa tumoral específicamente y que pueden inducir memoria inmunológica para controlar la actividad tumoral (Granados D, Delgado G. 2008). En este proceso, el primer paso es proporcionar a las CD los antígenos específicos de tumores. Esto se puede lograr ya sea mediante el cultivo *ex vivo* de las CD que han sido derivadas de pacientes con un adyuvante (que induce la maduración de las CD), el antígeno específico de tumor y luego inyectar de nuevo estas células en el paciente, o mediante la inducción de las CD para tomar los antígenos específicos del tumor *in vivo*. Para mejorar el uso terapéutico de la vacunación con CD es importante comprender la biología de las CD y cómo estas regulan el sistema inmune innato y adaptativo (Young *et al.* 2007).

Un característica importante de las CD es que pueden reconocer la activación de las CD contribuye a los efectos terapéuticos que se asocian con la activación no específica de la inmunidad antitumoral (Gerold *et al.* 2003). Desde entonces, la vacuna de Bacillus

de Calmette-Guerin (BCG) se ha utilizado para la terapia local de carcinoma de vejiga. Al igual que la vacuna de CD para el cáncer de próstata sipuleucel-T (Provenge®), esta vacuna refuerza el sistema inmunológico para que ataque las células cancerosas de la próstata en el cuerpo (Ardaví *et al.* 2004).

La vacuna debe ser específicamente para cada paciente, esto es autóloga. Para producir esta vacuna, se extraen los glóbulos blancos de la sangre del paciente por varias horas mientras el paciente es conectado a una máquina de aféresis. Entonces, las células se envían a un laboratorio, donde son expuestas a una proteína de las células cancerosas de la próstata llamada, fosfatasa ácida prostática. Luego se envían las células al consultorio médico u hospital, donde se devuelven al paciente mediante una infusión venosa. Este proceso se repite dos o más veces con 2 semanas de diferencia, de manera que el paciente reciba 3 dosis de células. Una vez en el cuerpo, las células ayudan a otras células del sistema inmunológico a atacar el cáncer de próstata (Ardaví *et al.* 2004).

Los modelos de ratón con cáncer demuestran que las CD pueden capturar antígenos tumorales que se liberan de las células tumorales, ya sea vivas o muertas y presentar estos antígenos a las células T en los ganglios linfáticos de drenaje del tumor. Esto resulta en la generación de linfocitos T citotóxicos específicos del tumor que contribuyen al rechazo del tumor. Por lo tanto, las CD representan importantes objetivos para las intervenciones terapéuticas en el cáncer (Young *et al.* 2007).

Algunos estudios se han realizado utilizando la inmunoterapia para tratar el TVT. Chung *et al.*, 2009, evaluaron los efectos de la inmunoterapia *in vivo*, utilizando plásmidos, IL-6 y IL-15. Se inocularon 6 perros Beagle, con  $1 \times 10^8$  células de un cultivo fresco de TVT, vía subcutánea en las aéreas laterales posteriores cerca de la cadera. Luego de que el tumor midiera 2 cm aproximadamente se empezó el tratamiento intratumoral de plásmidos mediado por electroporación. Ellos utilizaron dos grupos experimentales, el primero, el grupo A, con 3 perros, aplicaron IL-6, IL-15 (1mg/mL). El grupo B era el control, el cual no tenía plásmidos. Como resultados obtuvieron que los plásmidos inhibieran el crecimiento tumoral. Mientras que con el grupo control, sin



plásmidos el tumor continuo su crecimiento progresivo de 6 cm. Los investigadores reportaron que hubo un incremento en la expresión de CMH en células de TVT, de un 5.9% a un 34% respectivamente. De igual manera hubo un aumento en los linfocitos infiltrantes de tumor, de  $6.96 \pm 0.23\%$  a un  $21.63 \pm 5.40\%$  respectivamente (Chung *et al.*, 2009).

Chien Chun *et al.*, 2011 evaluaron el comportamiento inmunopatogénico del modelo de TVT en caninos con inmunoterapia con híbridos de células dendríticas y células del tumor. Ellos prepararon las células dendríticas de la médula ósea y luego evaluaron su fenotipo (CD80, CD83, CD86, CD1a, CD11c, CD40 y CMH II), la captación de antígenos y su capacidad de presentación. Híbridos de células dendríticas con células de TVT se utilizaron luego como una vacuna que se administró tres veces en intervalos de dos semanas por vía subcutánea cerca de los ganglios linfáticos inguinales bilaterales. En comparación con los perros no vacunados, las vacunas inhibieron sustancialmente la progresión del tumor ( $p < 0.05$ ) y aceleraron la tasa de regresión amplificando la respuesta inmune adaptativa específica del tumor y la citotoxicidad de las NK ( $p < 0.001$ ). El grupo vacunado mostro una regresión tumoral en la semana 5 comparado con la regresión tumoral del grupo control que ocurrió en la semana 7, en esta etapa el tamaño del tumor sin vacunar fue de  $174\text{cm}^3$ , comparado con los  $52\text{cm}^3$  del grupo vacunado. El examen patológico reveló principios de la infiltración masiva de linfocitos dando como resultado la necrosis del tumor, además no se encontraron efectos secundarios. En conclusión, sus datos proporcionaron un valor de referencia que muestra que el TVT es un modelo de uso potencial para el estudio de la inmunidad provocada por las vacunas de CD contra tumores (Chien Chun *et al.*, 2011).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Debido a la gran cantidad de muertes anuales que causa el cáncer y a que sus tratamientos hoy en día causan muchos efectos secundarios, las investigaciones se centran en buscar nuevos tratamientos para dicha enfermedad. Además de la cirugía, quimioterapia, radioterapia que son los tratamientos de primera opción para el cáncer se quiere implementar a la inmunoterapia como uno de primera opción. Al utilizar caninos como modelos de estudio en este trabajo, se espera obtener resultados y parámetros más similares al de los humanos para posibles usos en un futuro y poder establecer protocolos de inmunoterapia autóloga con CD.

#### **4. HIPÓTESIS**

La inmunoterapia autóloga con células dendríticas puede afectar el crecimiento del tumor venéreo transmisible en caninos.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo General**

Determinar la efectividad de la inmunoterapia autóloga utilizando CD en modelos caninos con TVT.

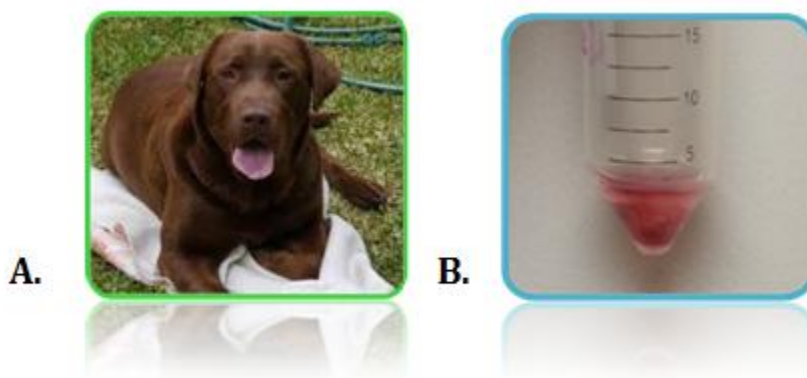
### **5.2 Objetivos Particulares**

1. Diferenciar monocitos a CD autólogas *in vitro*.
2. Evaluar la capacidad fagocítica de las CD autólogas *in vitro*.
3. Realizar un modelo experimental para el desarrollo del TVT.
4. Implementar el modelo *in vivo* de inmunoterapia con CD autólogas en caninos con TVT.
5. Evaluar los efectos secundarios de la inmunoterapia con CD autólogas y la regresión tumoral *in vivo*.
6. Identificar las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en sangre periférica.
7. Evaluar los niveles de IFN- $\gamma$  en suero sanguíneo.
8. Evaluar la capacidad inmunológica del extracto tumoral total de TVT como método de prevención *in vivo*.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Biopsia primaria del tumor venéreo transmisible

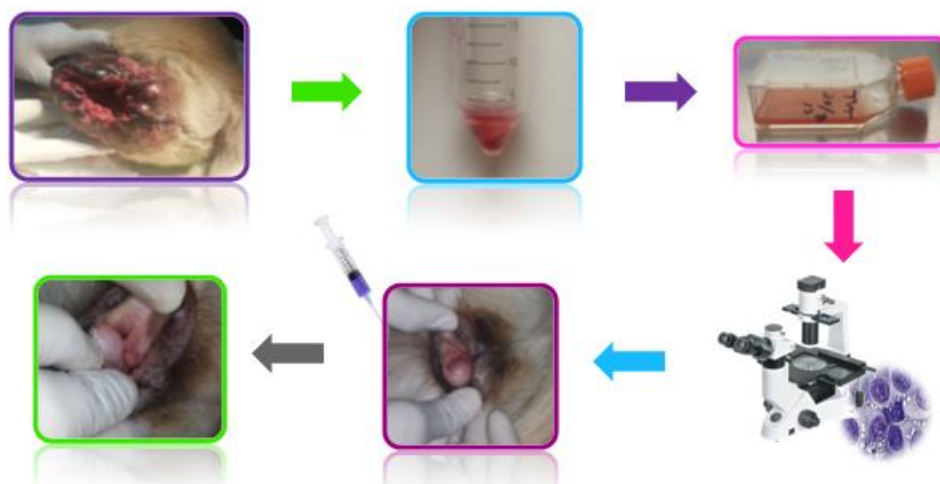
La Facultad de Medicina y Veterinaria de la UANL nos donó una biopsia de TVT de una hembra de raza Labrador de 3 años de edad (**Figura 3, A**) de aproximadamente 3 cm de tamaño, la cual ya había sido confirmada con anterioridad por el Departamento de Patología de la misma facultad (**Figura 3, B**). Los resultados de la histopatología mostraban lo siguiente: macroscópicamente, tumor en órgano genital vagina en la cual se encontraron múltiples nódulos de 2-3 cm con aspecto de coliflor los cuales presentaron una consistencia friable con zonas de hemorragias. Microscópicamente se encontró una morfología celular; 14-30  $\mu$ M, redonda a poliédrica, núcleo central, 1 o 2 nucléolos, citoplasma ligeramente granular con presencia de vacuolas, también se encontraron múltiples linfocitos que infiltraban al tumor. Esta muestra se dividió en dos pedazos de aproximadamente 1 cm de tamaño cada uno, la primera para un cultivo primario de células de TVT y la segunda para poder inocular a nuestra paciente cero (denominamos paciente cero a nuestro reservorio del tumor).



**Figura 3. Biopsia del tumor venéreo transmisible.** A) Perra donante de la biopsia de la FMVZ de la UANL. B) Biopsia tumoral de la cual se realizó el cultivo primario de las células de TVT y el ETT.

## 6.2 Disgregación y cultivo de las células del tumor venéreo transmisible para la inoculación de nuestra paciente cero

Los dos pedazos de la biopsia donada se lavaron con PBS para quitar el exceso de sangre y se sometieron a una digestión mecánica automatizada (Becton Dickinson, Medimachine). Varias muestras de  $10\text{ mm}^3$  se depositaron en la cámara (Medicon) y se mezclaron cada una con  $500\text{ }\mu\text{L}$  de solución PBS. Las muestras se corrían por 30 segundos para ser disgregadas y luego se le hicieron dos lavados con PBS y se filtraron a través de una membrana Millipore de  $70\text{ }\mu\text{m}$ . Se realizó un conteo celular de  $4 \times 10^{10}$  y se cultivaron en las placas de 6 pozos con medio DMEM, suero fetal bovino (SFB, Gibco) al 10%, antibiótico-antimicótico (Gibco), se incubaron a una temperatura de  $37^\circ\text{C}$  y con una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Luego incubarlas por 24 horas se tomaron  $1 \times 10^8$  células para inocular a nuestra paciente cero, se tranquilizó con xilacina 10%, se anestesió con zoletil 100 y se desinfectó el área de la vulva y la vagina. Se tomaron las células que se cultivaron y se inyectaron  $1 \times 10^8$  células de TVT en la mucosa por las paredes de la vagina. También se les aplicó 1 mL vía intramuscular (IM) de estrógenos. Luego se esperó 82 días hasta que el tumor alcanzó un tamaño de 20 cm para poder inocular a nuestras pacientes de los grupos experimentales con este mismo protocolo (Figura 4).



**Figura 4. Implantación y desarrollo del tumor venéreo transmisible a nuestros grupos experimentales.** En este esquema podemos apreciar nuestro paciente donador del TVT y la biopsia tumoral que nos donó la FMVZ de la UANL. De la biopsia se realizó una disgregación mecánica y un cultivo primario del cual se utilizó  $1 \times 10^8$  células de TVT para inocular a nuestra paciente cero.

### 6.3 Implantación de las células del tumor venéreo transmisible en nuestros pacientes

Se utilizaron 3 hembras por cada grupo experimental, de aproximadamente 2 años de edad, de raza criolla y de talla mediana. Durante el desarrollo del experimento los animales tuvieron libre acceso a agua y alimento, además de cumplir con la NOM-062-ZOO-1999. Los grupos experimentales que se utilizaron fueron los siguientes: el tumor sin tratamiento, el tumor más sangre completa autóloga como tratamiento y el tumor tratado con CD autólogas específicas del TVT.

Grupos	Tratamientos
Control 1	Tumor sin tratamiento
Control 2	Tumor + sangre autóloga completa
Terapia	Tumor + CDs autólogas específicas

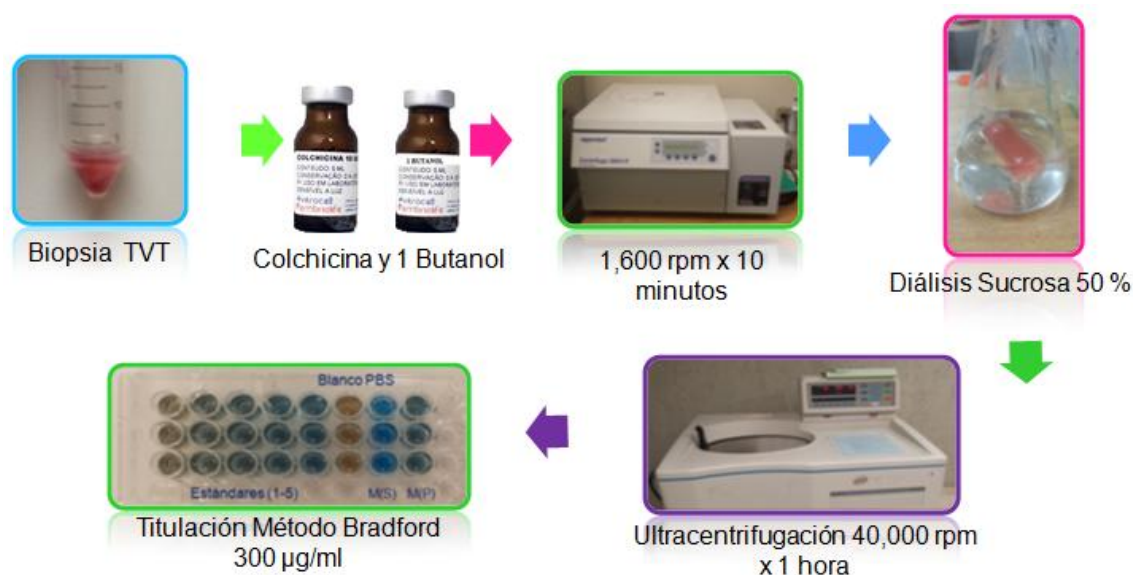
**Tabla 1. Grupos Experimentales.** Se utilizaron tres caninos hembras por cada grupo experimental de aproximadamente dos años de edad, cumpliendo con lo establecido en la NOM-062-ZOO-1999.

Una vez que el tumor de nuestra paciente cero alcanzó un tamaño de 20 cm se le tomó una biopsia para obtener las células de TVT y poder inocular a nuestras pacientes de los grupos experimentales. Este proceso fue similar al descrito en el proceso de disgregación y obtención de las células del tumor venéreo transmisible para la inoculación de nuestra paciente cero. Luego de la inoculación de las células tumorales en las pacientes se esperó aproximadamente 60 días a lo que se desarrollaba el TVT.

### 6.4 Preparación del extracto tumoral total del tumor venéreo transmisible con 1-butanol y colchicina

Una vez que creció el tumor en nuestras pacientes del grupo tratado con CD específicas de TVT se obtuvo una biopsia del tumor de cada hembra y se utilizó para crear el extracto tumoral total. Estas se sometieron a una digestión mecánica

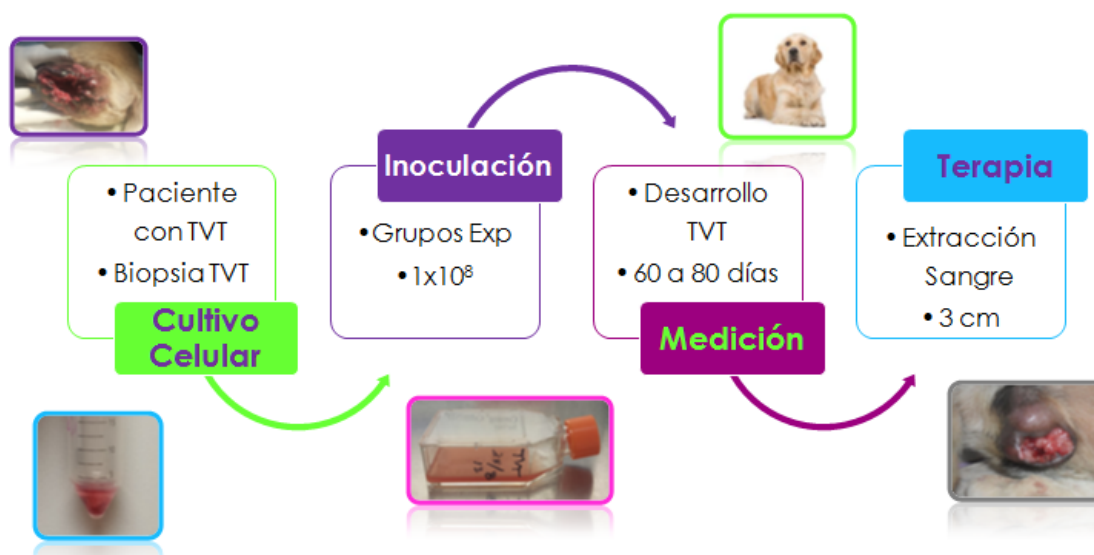
automatizada descrita anteriormente. Las células se pasaron por el filtro interno en suspensión líquida y se filtró en poros de tamaño 50  $\mu\text{m}$  (Falcon), se realizó un conteo celular de  $4 \times 10^{10}$  y se incubó por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  en 5 mL de colchicina a 1  $\mu\text{M}$ , esto para la disrupción de la organización de microtúbulos en el citoesqueleto y liberación de antígenos, **Figura 5**. Luego se lavó con PBS y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  por 5 minutos en 1-butanol (2.5% v/v). Después las células se centrifugaron a 1,200 rpm por 10 minutos, se tomó el sobrenadante y se realizó una diálisis (Spectra/Por) en sucrosa al 50% (MWCO 12-14 kDa), seguida de una equilibración contra PBS. Continuando con una ultracentrifugación a 40,000 rpm (Max) por una hora, tomando el sobrenadante y obteniendo nuestro extracto tumoral total (ETT).



**Figura 5. Preparación del extracto tumoral total del tumor venéreo transmisible con 1-butanol y colchicina.** Luego de esperar que el tumor creciera realizamos una biopsia para realizar el ETT de TVT. Esta se sometió a una digestión mecánica automatizada y se incubó con 1-butanol y colchicina, luego se le realizó una diálisis con sucrosa al 50%, una ultracentrifugación y por último se realizó una titulación mediante el método de Bradford.



## 6.5 Diseño experimental



**Figura 6. Diseño Experimental.** Una vez inoculada nuestra paciente cero se le realizó una biopsia del tumor para hacer un cultivo celular y poder inocular a nuestros grupos experimentales con  $1 \times 10^8$  células de TVT. Cuando el tumor alcanzó los 3 cm de tamaño se comenzó la extracción de sangre para empezar la inmunoterapia con CD autólogas específicas para TVT.

## 6.6 Preparación y mantenimiento de las alícuotas de citocinas recombinantes caninas para la diferenciación celular

**NOTA:** Las citocinas son proteínas sumamente delicadas y deben manipularse con sumo cuidado, los viales proporcionados por la empresa PeproTech contienen la proteína liofilizada y se pueden almacenar en estas condiciones en temperatura de congelación hasta por 3 años, si se va a trabajar con ellas, deben reconstituirse en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal y hacer alícuotas de trabajo en base a las unidades requeridas para trabajar, todo esto en un área estéril en campana de flujo laminar y realizando la manipulación en frío (hielo) con material como puntillas y pipetas estériles. Evitar congelaciones y descongelaciones de las alícuotas ya que estos procesos alteran la actividad biológica de las citocinas disminuyendo su efecto.

### **GM-CSF (Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Monocitos)**

Las dosis de estimulación para el protocolo de CD en un lapso de 48 horas es de 1,000 U/mL por lo cual se harán alícuotas de trabajo de 100 µL en donde 25 µL contengan la dosis deseada de 1,000 U utilizando las especificaciones de la hoja técnica del reactivo proporcionada por la empresa PeproTech.

### **IL-4 (Interleucina 4)**

Las dosis de estimulación para el protocolo de CD en un lapso de 48 horas es de 500 U/mL por lo cual se harán alícuotas de trabajo de 100 µL en donde 25 µL contengan la dosis deseada de 500 U utilizando las especificaciones de la hoja técnica del reactivo proporcionada por la empresa PeproTech.

### **IL-1 $\beta$ (Interleucina 1 Beta)**

Las dosis de estimulación para el protocolo de CD en un lapso de 48 horas es de 10 ng/mL por lo cual se harán alícuotas de trabajo de 40 µL en donde 5 µL contengan la dosis deseada de 10 ng utilizando las especificaciones de la hoja técnica del reactivo proporcionada por la empresa PeproTech.

### **TNF- $\alpha$ (Factor de Necrosis Tumoral Alfa)**

Las dosis de estimulación para el protocolo de CD en un lapso de 48 horas es de 1000 U/mL por lo cual se harán alícuotas de trabajo de 100 µL en donde 25 µL contengan la dosis deseada de 1000 U utilizando las especificaciones de la hoja técnica del reactivo proporcionada por la empresa PeproTech.

## **PGE<sub>2</sub> (Prostaglandina E2)**

La concentración de este reactivo requerida para el protocolo de estimulación de CD en un lapso de 48 horas es de 1  $\mu$ M y se preparará en base a las especificaciones de peso molecular del reactivo.

### **6.7 Protocolo de aislamiento de células mononucleares de sangre periférica y diferenciación a células dendríticas**

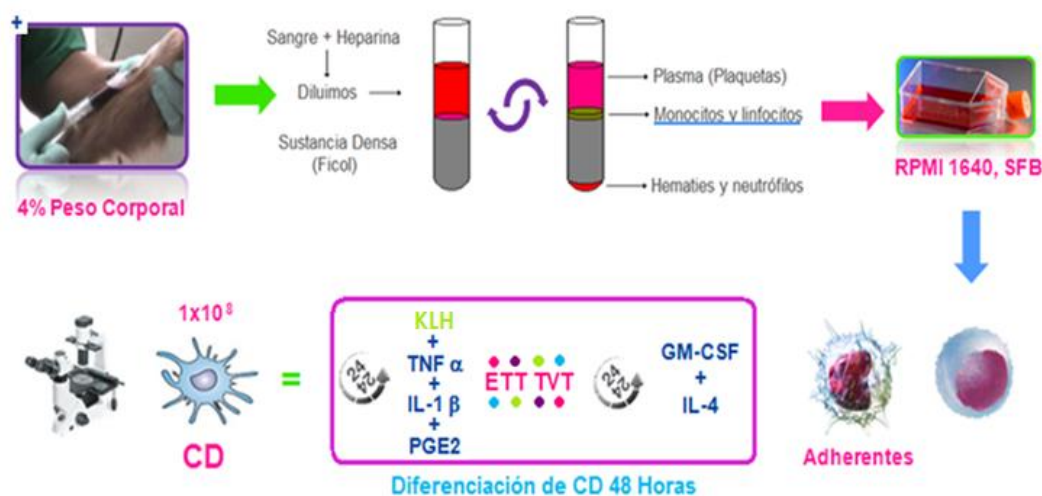
Una vez los tumores alcanzaron un tamaño de aproximadamente 3 cm, se realizaron las biopsias y se comenzó con el protocolo de aislamiento de células mononucleares de sangre periférica y diferenciación a células dendríticas.

- Se colectó el 4% del peso corporal de sangre periférica de las hembras por medio de punción venosa yugular utilizando el dispositivo de aguja Safety-Lock de BD Vacutainer en tubos al vacío heparinizados.
- La sangre se colectó en un tubo Falcon de 50 mL y se diluyó 1:1 con PBS.
- Se colocaron 20 mL de Ficoll-Hypaque en 2 tubos Falcon de 50 mL de fondo cónico con el uso de una pipeta de 10 mL.
- De manera muy cuidadosa, se tomaron 20 mL de la muestra de sangre y se vertieron despacio por la pared de cada uno de los tubos de 50 mL que contienen Ficoll-Hypaque, de tal forma que no se rompió la fase entre los dos líquidos.
- Al terminar de verter la sangre, los tubos se taparon y se centrifugaron a 400 g por 30 minutos a una temperatura de 25°C, asegurándonos de que el freno de la centrífuga estuviese desactivado.
- Una vez que transcurrieron los 30 minutos, se observó en los tubos 4 capas: la capa superior que es el suero rico en plaquetas, la siguiente capa que es densa y de color blanco que es donde se encuentran las células mononucleares, la siguiente capa es el reactivo Ficoll-Hypaque y finalmente en el fondo del tubo el paquete globular (glóbulos rojos).

- Con la ayuda de una micropipeta de 1,000  $\mu$ L y de forma muy cuidadosa, se colectó en un tubo de 15 mL de fondo cónico solamente la segunda capa que son las células mononucleares (linfocitos y monocitos), teniendo cuidado de no aspirar tanto suero ni tampoco el Ficoll que está en la parte inferior, esto con el fin de evitar contaminación celular de plaquetas y granulocitos.
- Una vez que se colectó la capa de células mononucleares, se sometieron a dos lavados utilizando PBS 1X estéril.
- Para el primer lavado, se le añadió un volumen de PBS 1X a los tubos de 15 mL que contienen las células mononucleares, se taparon, y se llevaron a centrifugación a 200 g por 20 minutos a 25°C.
- Transcurridos los 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se conservó el pellet celular.
- El pellet se resuspendió en 15 mL de PBS 1X, el tubo se tapó y se llevó nuevamente a centrifugación, a 200 x g por 10 min a 25°C.
- Transcurridos los 10 minutos, se decantó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en medio RPMI 1640 suplementado con SBF al 10%.
- Se tomó una alícuota de 50  $\mu$ L, la cual se utilizó para contar el número total de células mononucleares que se tienen por mL por medio de exclusión con zul tripan.
- Una vez que se determinó el número total de células obtenidas en la separación, se ajustó el número a  $2 \times 10^6$  células y se sembraron en placas de cultivo de 6 pozos en un volumen final de mililitro de medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 10% y antibiótico-antimicótico (Gibco) por pozo.
- Estas placas se llevaron a incubación por un periodo de 3 horas, en una incubadora con atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y una temperatura de 37°C.
- Tras este periodo de incubación de 3 horas, los monocitos que son las células con la capacidad de adherencia al plástico, quedaron pegadas a la superficie de la placa, mientras que el resto de las células, principalmente linfocitos permanecieron suspendidos en el medio.
- Se retiraron los sobrenadantes de las placas, las células que permanecieron adheridas a la superficie plástica de la placa, se lavaron 2 veces con PBS 1X

estéril utilizando la micropipeta de 1,000  $\mu$ L y tratando de barrer gentilmente todas aquellas células que no estaban adheridas.

- Finalmente se les agregó 1 mL de medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 10% a los pozos que tenían las células adherentes y estas se sometieron al proceso de estimulación y diferenciación de células dendríticas de 48 horas descrito en el protocolo correspondiente.
- Las placas que contenían las células adherentes se llevaron a incubación en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C en donde el primer lapso de 24 horas de incubación se estimularon con GM-CSF a una concentración de 1,000 U/mL e IL-4 a una concentración de 500 U/mL.
- Una vez transcurrieron las primeras 24 horas, se agregó el ETT de TVT para su captación por las células dendríticas inmaduras en una concentración de 10  $\mu$ g/mL por 2 horas, junto con el adyuvante Key-hole limpet hemocyanin (KLH) en 20  $\mu$ g/mL.
- Tras el tiempo transcurrido se incubaron las células por 24 horas más con estímulos de IL-1 $\beta$  a una concentración de 10 ng/mL, TNF- $\alpha$  a una concentración de 1,000 U/mL, IL-6 a una concentración de 10 ng/mL y PGE<sub>2</sub> en una concentración 1  $\mu$ M.
- Transcurrido el segundo periodo de 24 horas de incubación se evaluó la viabilidad celular por el método de azul tripan y se evaluó la morfología por medio de visualización en el microscopio invertido. Se muestra un esquema en la **Figura 7**.



**Figura 7. Protocolo de diferenciación de monocitos a células dendríticas en 48 horas.** Una vez obtenida la sangre de la paciente se le realiza una separación celular con Ficoll y se aíslan los monocitos y linfocitos. Estos se cultivan en medio RPMI 1640 por 24 horas y se retiran las células no adherentes, los linfocitos y nos quedamos con las células adherentes, los monocitos. A estos se le aplican las primeras citocinas IL-4 y GM-CSF por 24 horas y luego se estimulan por 24 horas más con el ETT de TVT, KLH, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y PGE2. Al final se hace una evaluación morfológica, de fenotipificación y de la capacidad fagocítica.

## 6.8 Análisis fenotípico de las células dendríticas obtenidas a partir de monocitos de sangre periférica

Luego de la incubación durante 48 horas con los estímulos de GM-CSF, IL-4, ETT de TVT, KLH, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y PGE2, se retiró el sobrenadante de los pozos, se hizo un lavado con PBS y se le aplicó a cada pozo 500  $\mu$ L de tripsina (Gibco) y se incubaron por 3 minutos. Pasado el tiempo se vieron en el microscopio y se les agregó 500  $\mu$ L de medio RPMI 1640 con SFB al 10% para inactivar la Tripsina. Luego se lavaron dos veces las células con PBS (1,200 rpm por 10 min), se ajustó la cantidad de células a  $1 \times 10^7$  y se resuspendieron en 500  $\mu$ L de PBS en tubos de poliestireno de 1 mL. Se les añadieron 5  $\mu$ L de los respectivos anticuerpos CD14, CD80, CD83 y DLA II a cada tubo por separado. Se incubaron por 30 minutos en hielo y en obscuridad. Tras la incubación con los anticuerpos, se les dió un lavado con 1 mL de PBS 1X centrifugando a 1,200 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante para eliminar el exceso de anticuerpos y

se resuspendió nuevamente el pellet en 500  $\mu$ L de PBS 1X para ser leídos en el citómetro de flujo. Como control negativo, se leyeron tres tubos con  $5 \times 10^5$  células sin ningún anticuerpo, con esto se determinó las zonas de positividad y negatividad de los histogramas para los marcadores antes mencionados.

## **6.9 Ensayo de fagocitosis de células dendríticas inmaduras obtenidas a partir de monocitos de sangre periférica**

La capacidad fagocítica de las CD inmaduras se probó mediante la capacidad de captación del reactivo FITC-Dextran (Sigma). Se utilizaron  $1 \times 10^8$  células para el ensayo y se cultivaron en 3 placas de 6 pozos con 1mL de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con SFB al 10% (GIBCO). Todas las placas se incubaron por tres horas, la primera en presencia de 1 mg/mL de FITC-Dextran a 37 °C con un ambiente de 5% de CO<sub>2</sub>. Como controles, la segunda placa con la misma concentración de CD a diferencia que se incubó en medio RPMI 1640 sin FITC-Dextran por 3 horas a 37°C y la última placa con la misma concentración celular, pero se incubaron con 1 mg/mL de FITC-Dextran a 4°C, **Figura 8**. Después del tiempo de incubación, las células se sometieron a 3 lavados con PBS 1X frío suplementado con SFB al 1% para eliminar el exceso de FITC-Dextran que se encuentra en el medio o adherido inespecíficamente a la superficie de las células. Posterior a los lavados, las células se resuspendieron en un volumen final de 500  $\mu$ L de PBS 1X y se analizaron por Citometría de Flujo (Accuri C6 Becton Dickinson).

### **Notas:**

- El proceso de fagocitosis se ve inhibido a bajas temperaturas de ahí la placa control incubada con FITC-Dextran a 4°C.
- Las muestras deben ser leídas lo más pronto posible una vez terminado el ensayo para evitar la pérdida de fluorescencia.

## Observaciones generales

Todos los procedimientos de aislamiento, manipulación de las células y reactivos debe realizarse en un área estéril, en una campana de flujo laminar, y utilizando material debidamente esterilizado para evitar cualquier tipo de contaminación en el cultivo celular.



**Figura 8. Ensayo de fagocitosis con FITC-Dextran.** Para medir la capacidad fagocítica de las CD inmaduras utilizamos  $1 \times 10^8$ . Estas se lavaron y se separaron en tres grupos, uno con FITC-Dextran (1mg/mL) a 37°C, otro con FITC-Dextran (1mg/mL) a 4°C (en donde se inhibe la fagocitosis) y otro con RPMI 1640 solo a 37°C. Estos se incubaron por 3 horas, se realizaron dos lavados con PBS y se hizo la lectura en el citómetro de flujo.

### 6.10 Preparación de la vacuna de células dendríticas autólogas contra el tumor venéreo transmisible

Una vez que se comprobó la capacidad fagocítica de nuestras CD y transcurridas las 48 horas del protocolo de diferenciación de monocitos a CD se retiró el sobrenadante de las placas y se hicieron dos lavados con PBS para retirar algún restante del medio. Luego se le aplicó 500  $\mu$ L de tripsina, se esperó a que las células dendríticas se despegaran, aproximadamente 5 minutos y una vez corroborado en el microscopio que se despegaron se neutralizó la tripsina con medio RPMI 1640 con SFB al 10%. Se recolectaron las CD en un tubo Eppendorf de 50 mL y se le realizaron 3 lavados con PBS a 1,200 rpm por 10 minutos a 25°C, **Figura 9**. Luego se ajustaron las células a  $1 \times$



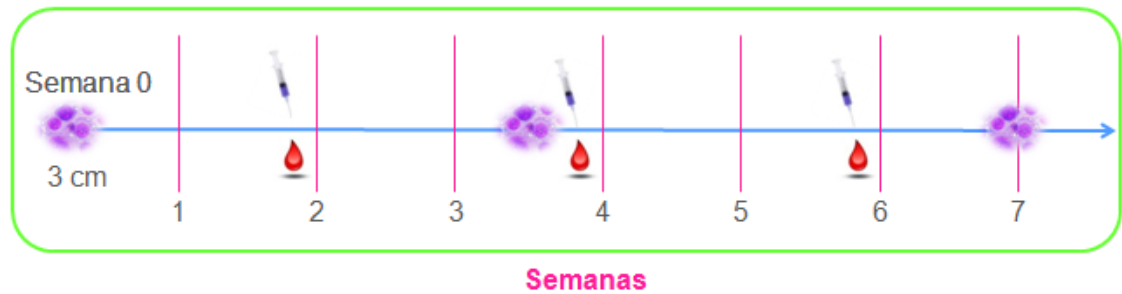
$10^7$  y se resuspendieron con 1 mL de PBS y se recolectaron con una jeringa de 3 mL y se mantuvieron en refrigeración hasta el momento de su aplicación.



**Figura 9. Preparación de la vacuna de células dendríticas autólogas contra el tumor venéreo transmisible.** Al terminar su proceso de diferenciación las CD son separadas con tripsina y recolectadas para luego realizarle tres lavados. Luego se diluyeron en 1 mL de PBS y se mantuvieron en refrigeración hasta su aplicación subcutánea cerca de un nódulo linfático.

### 6.11 Aplicación de la inmunoterapia autóloga con células dendríticas específicas para el tumor venéreo transmisible

Una vez realizadas todas las pruebas de fenotipificación de las CD, medir su función de fagocitosis y que el tumor tuviese el tamaño adecuado de 3 cm se comenzó con las terapias. Tres ciclos de inmunoterapia con CD autólogas específicas del ETT de TVT ( $1 \times 10^8$ ) se aplicaron en intervalos de dos semanas por vía subcutánea cerca del nódulo linfático poplíteo y se realizó un periodo de observación durante seis meses, como se muestra en el esquema de la **Figura 10**.



**Figura 10. Protocolo de aplicación de la inmunoterapia autóloga con células dendríticas.** Se aplicaron tres vacunas subcutáneamente en intervalos de dos semanas cada una.

### **6.12 Evaluación de la inmunoterapia autóloga con células dendríticas, sus efectos secundarios y tamaño tumoral**

Una vez empezadas las inmunoterapias autólogas con las CD se observaron a las pacientes en varios criterios, su apetito, comportamiento, fiebre, náuseas, vómitos, escalofríos e hipersensibilidad. También se les realizaron biometrías hemáticas y químicas sanguíneas cada dos semanas para ver algún efecto por los siguientes dos meses. Además se evaluó el tamaño del tumor cada tercer día después de aplicar el tratamiento, el volumen del tumor (mm) se calculó utilizando la fórmula: longitud (mm) x anchura (mm) x altura (mm) x  $\pi/4$ . De forma paralela se les realizó una biopsia tumoral antes de la terapia (3cm de la masa tumoral), al día 0 y 15 después del tratamiento. Las muestras tumorales de cada paciente se utilizaron para histopatología.

### **6.13 Análisis de las poblaciones de linfocitos en sangre periférica**

Se realizó un análisis por citometría de flujo con el propósito de evaluar las poblaciones de linfocitos T  $CD3^+$ ,  $CD4^+$  y  $CD8^+$  en sangre periférica utilizando anticuerpos monoclonales antiCD3, antiCD4, antiCD8, antes y después de la terapia autóloga (día 0, 27 y 58). Se utilizó un kit comercial triple de anticuerpos monoclonales anti canino CD3-FITC, CD4-RPE, CD8-Alexa Fluor de Serotec, que fueron utilizados

empleándose las instrucciones dadas por el fabricante. Los porcentajes de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> serán analizados por citometría de flujo (Accuri C6 Becton Dickinson).

#### **6.14 Determinación de los niveles de IFN- $\gamma$ en el suero sanguíneo por ELISA**

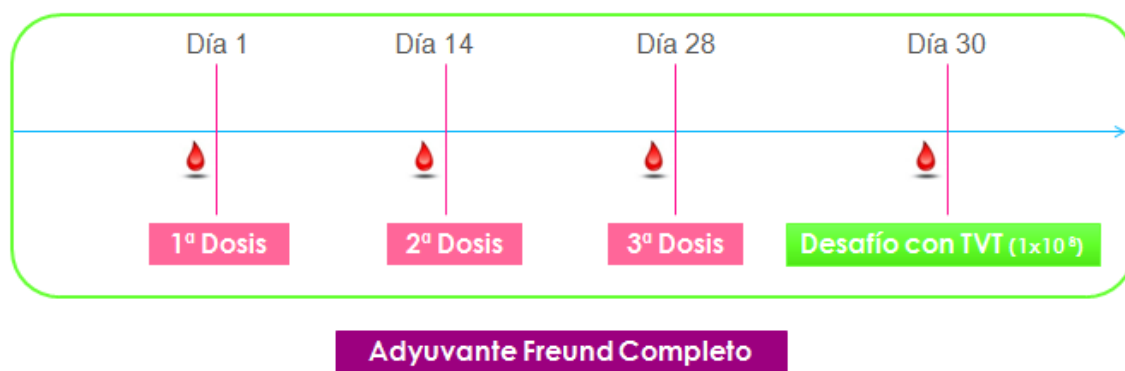
Para evaluar la función de las células dendríticas en activar a los linfocitos T se realizó una prueba para medir los niveles de IFN- $\gamma$  del suero de los pacientes que se les aplicó la inmunoterapia. El análisis se llevó a cabo en la semana 0, semana 4 y semana 8 mediante un ELISA sándwich en fase sólida. El nivel de IFN- $\gamma$  se determinó mediante el uso de un kit comercial, ELIPACK de R&D System, específico para IFN- $\gamma$  canino, con una sensibilidad de 60 pg/mL, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se les agregaron 50  $\mu$ L del diluyente a cada pozo, lo siguiente fue agregar 50  $\mu$ L de suero canino a cada pozo, golpear suavemente la placa por 1 minuto gentilmente, luego se cubrió con una tapa para placas y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Transcurrido el tiempo se lavaron 5 veces y se agregaron 100  $\mu$ L del conjugado a cada pozo y se cubrió con un nuevo sellador de placas incubando a temperatura ambiente durante 1 hora. Se aspiró y se lavaron 5 veces. Se agregaron 100  $\mu$ L de Streptavidina a cada pozo y se cubrió con un nuevo sellador de placas y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se volvió a aspirar y se lavaron 5 veces más. Se añadieron 100  $\mu$ L de la solución de sustrato a cada pozo y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos protegiendo de la luz. Por último se agregó la solución de stop a cada pozo. Los niveles de IFN- $\gamma$  se analizaron en un lector de 450 nm inmediatamente (Hsiao *et al.*, 2008).

#### **6.15 Evaluación histológica del tumor venéreo transmisible en pacientes tratados con inmunoterapia autóloga con células dendríticas específicas del tumor**

Para evaluar los cambios histológicos en el tumor antes y después de la inmunoterapia se tomaron muestras del tumor y se fijaron en formalina, posteriormente se realizaron cortes de 5  $\mu$ m de la biopsia, fueron teñidas con hematoxilina y eosina y observadas al microscopio en con un objetivo de 20 X.

### 6.16 Evaluación de la capacidad inmunológica del extracto tumoral total del tumor venéreo transmisible como método de prevención *in vivo*

Nuestro último objetivo fue el evaluar la capacidad inmunológica del ETT de TVT en tres pacientes sanas. De una biopsia de nuestra paciente cero se obtuvo un ETT de TVT con 1-butanol y colchicina como se describió anteriormente y se le realizó una titulación mediante el método de Bradford obteniendo 300 µg/mL de proteínas. Se les aplicaron tres dosis de 1 mL del ETT de TVT en intervalos de dos semanas cada una con adyuvante Freund Completo por vía subcutánea. Al día 38 se retó a las hembras con  $1 \times 10^8$  células de TVT en las paredes de la vagina, esquema en la **Figura 11**. Cada dos semanas por seis meses se evaluó si había algún crecimiento tumoral.



**Figura 11. Protocolo de aplicación del extracto tumoral total del tumor venéreo transmisible.** Una vez obtenido nuestro ETT de TVT se le aplicó a tres caninos hembras, tres vacunas en intervalos de dos semanas cada una, vía subcutánea en el área del lomo. Luego a los 30 días se les aplicó  $1 \times 10^8$  células de TVT subcutáneamente por las paredes de la vagina y se observó si había crecimiento tumoral.

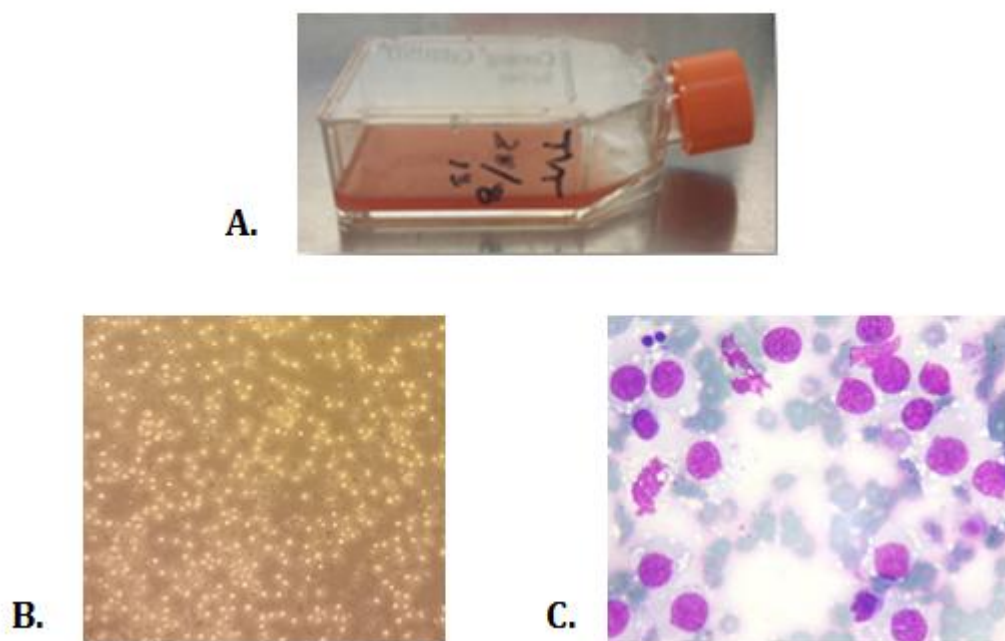
### 6.17 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, todos los cálculos se realizaron con el programa Statgraphics (Centurion XVI). Se realizaron intervalos de confianza de un 95%, un análisis de la varianza por ANOVA y una comparación de medias mediante T-Student. Las pruebas se realizaron por triplicado y se consideró significativo a un valor con  $p < 0.05$  (\*).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Cultivo primario de las células del tumor venéreo transmisible

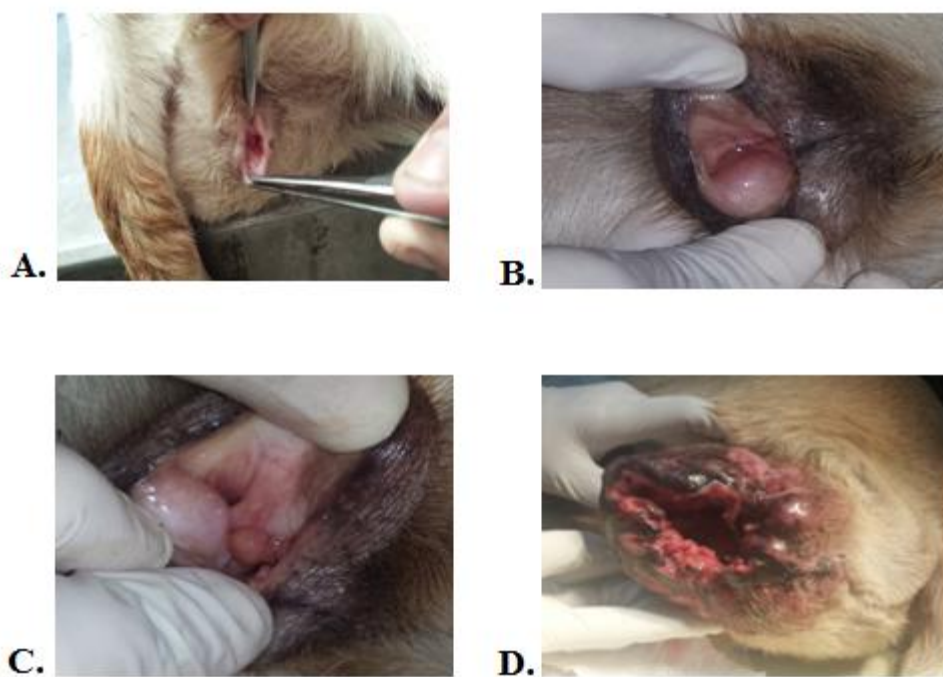
En la actualidad no existe una línea celular establecida del TVT, por lo cual en el presente estudio se pudo establecer un cultivo primario durante 10 días. Al observarse al microscopio se observaron células con un diámetro de 15-30  $\mu\text{m}$  con una morfología redonda, formando algunas ocasiones racimos, con un núcleo prominente el cual ocupaba la mayoría del citoplasma mismo que presentaba un aspecto eosinofílico el cual se encontraba vacuolado (**Figura 12**).



**Figura 12. Disgregación y cultivo de las células del tumor venéreo transmisible.** A) En la disgregación tumoral las células se cultivaron en DMEM suplementado con SFB al 10% y Anti-Anti. El cultivo se mantuvo viable durante 10 días aproximadamente. B) Células de TVT vistas al microscopio luego de haber sido disgregadas. C) Tinción de Giemsa de las células de TVT, en donde se observan células grandes y redondas, vacuolas citoplasmáticas y núcleo pronunciado que ocupa aproximadamente el 85% del citoplasma.

## 7.2 Inoculación, desarrollo y crecimiento tumoral en los modelos caninos

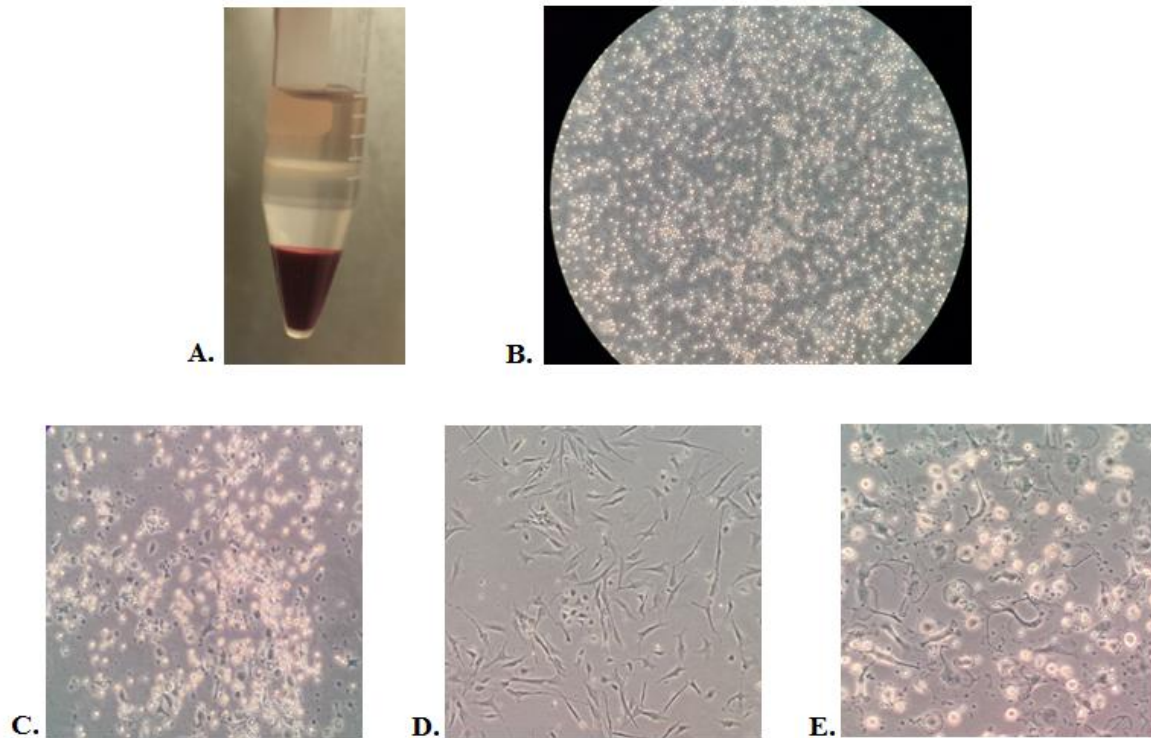
A los dos meses post inoculación se comenzó a ver una nodulación pequeña de aproximadamente 0.5 cm la cual fue creciendo paulatinamente. Para los 4 meses se observaba una apariencia de coliflor, nódulos en racimos, friables, vascularizados, característico del TVT. A los 6 meses post inoculación en nuestros grupos controles 1 y 2 el tumor tenía un tamaño de aproximadamente 140 cm, la estructura normal de la vagina se perdió, la masa tumoral estaba conformada por múltiples racimos con aspecto túrgido y de color rojizo debido a la gran cantidad de vascularidad que presenta el tumor. Esto ocurrió en todas nuestras pacientes, confirmando que fue un protocolo adecuado el que se utilizó para desarrollar experimentalmente el modelo de implantación de las células de TVT en la vagina de las pacientes (**Figura 13**).



**Figura 13. Desarrollo de la implantación del tumor venéreo transmisible.** A) Apariencia de la vulva normal de la paciente antes de la inoculación. B) Uno de los lugares donde se aplicaron las células de TVT. C) Luego de la aplicación de las células en la mucosa de la vagina podemos ver como se aprecian los pequeños nódulos, color rosa, característicos de TVT. D) Se aprecia una paciente del grupo control sin tratamiento donde podemos ver como desaparece completamente la morfología de la vagina y la túrgidez que presenta el tumor.

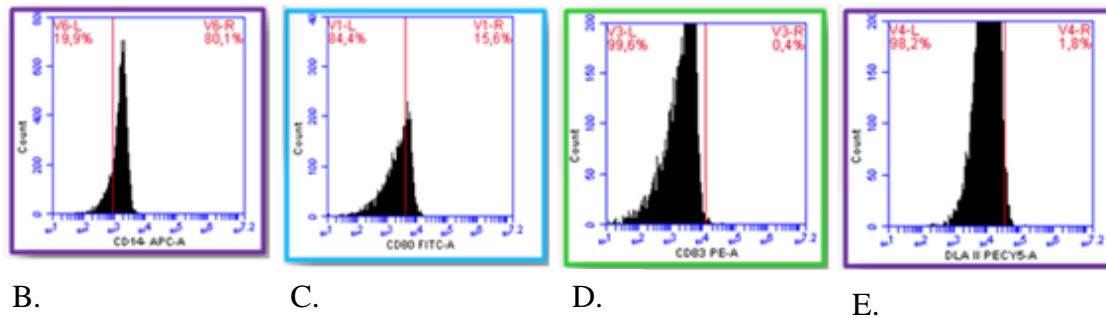
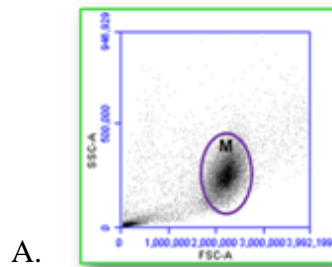
### 7.3 Diferenciación y fenotipificación de las células dendríticas específicas del tumor venéreo transmisible

Luego de 24 horas con el primer coctel de citocinas se observaron cambios morfológicos en las células, pequeñas prolongaciones de color grisáceo. Transcurridas 48 horas y de haber agregado el ETT de TVT, el KLH y las demás citocinas se aprecian cambios en las células, su color gris, su cambio morfológico completamente a uno delgado, con prolongaciones como dendritas y hasta CD veliformes (**Figura 14**). Se obtuvo una diferenciación celular de monocito a CD del 90% de las células cultivadas. Para el análisis fenotípico de los monocitos y las células dendríticas se utilizaron algunos marcadores característicos de ambas células ( $CD14^+$ ,  $CD80^+$ ,  $CD83^+$ , DLA II), esto se midió mediante citometría de flujo. Las células adherentes a las 0 horas, expresaron una expresión  $CD14^+$  en un 80.1%,  $CD80^+$  con 15.6%,  $CD83^+$  con 0.4% y DLA II con 1.8% (**Figura 15**). Estos resultados corroboran la presencia de monocitos expresando un gran porcentaje de  $CD14^+$ , mientras que los demás marcadores son típicos de células presentadoras de antígeno. A las 48 horas la expresión de  $CD14^+$  disminuyó a 8.7%, mientras que los marcadores  $CD80^+$  con 80.3%,  $CD83^+$  con 76.4% y DLAII con 86.5% aumentaron, estos son característicos de CD (**Figura 16**). Esto demuestra que nuestro protocolo de diferenciación fue exitoso y en un lapso de 48 horas se pudo obtener CD maduras veliformes.

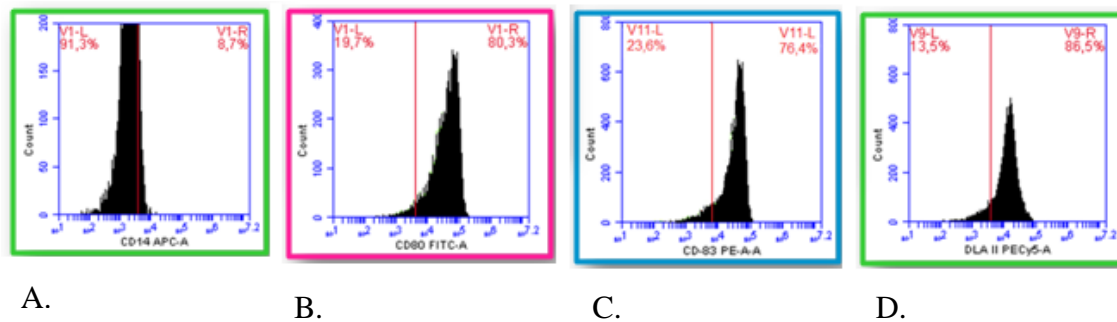


**Figura 14. Proceso de diferenciación de monocitos a células dendríticas.** **A)** Separación de los componentes sanguíneos mediante gradiente de densidad por Ficoll. En la segunda capa podemos ver una línea blanca en donde se encuentran nuestras células de interés, los monocitos y linfocitos. **B)** Se aprecia los monocitos ya adheridos a la placa luego de las 24 horas de incubación con medio RPMI. **C)** Luego de 24 horas con el primer coctel de citocinas podemos observar cambios morfológicos en las células, pequeñas prolongaciones de color grisáceo. **D)** Transcurridas 48 horas y de haber agregado el ETT de TVT, el KLH y las demás citocinas podemos ver cambios drásticos en las células, su color gris, su cambio morfológico completamente a uno delgado, con prolongaciones como dendritas, típicas de CD. **E)** Podemos apreciar las CD veliformes maduras en casi todas las células.





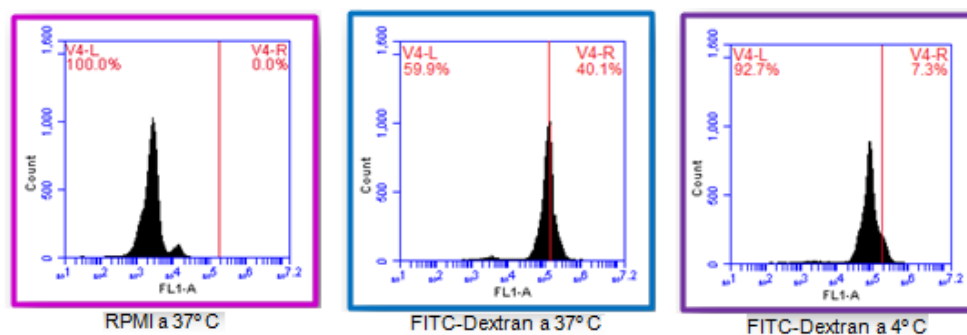
**Figura 15. Fenotipificación de monocitos por citometría de flujo.** A. En la primera figura podemos apreciar nuestra población de interés, los monocitos (M), su tamaño y granularidad. B. En el primer histograma se mide CD14<sup>+</sup> con 80.1%, C. CD80<sup>+</sup> con 15.6%, D. CD83<sup>+</sup> con 0.4% y E. DLA II con 1.8% de expresión celular. Lo que nos demuestra que si cumplen con los anticuerpos correctos de monocitos.



**Figura 16. Fenotipificación de células dendríticas por citometría de flujo.** A. En la primera figura se mide CD14<sup>+</sup> con 8.7%, B. CD80<sup>+</sup> con 80.3%, C. CD83<sup>+</sup> con 76.4% y D. DLA II con 86.5% de expresión celular. Lo que nos demuestra que si cumplen con los anticuerpos correctos de células dendríticas.

#### 7.4 Ensayo de fagocitosis con FITC-Dextran en células dendríticas inmaduras

En la prueba de fagocitosis obtuvimos los siguientes resultados, en el primer histograma se muestra el control con RPMI 1640 a 37°C y 0% de fagocitosis. En el segundo histograma con FITC-Dextran a 37°C se obtuvo 40.1% de fagocitosis. En el tercer histograma con FITC-Dextran a 4°C se expresó 7.3% de fagocitosis. Esto demuestra que nuestras células dendríticas inmaduras cumplen con su función de poder fagocitar nuestro ETT de TVT (**Figura 17**).

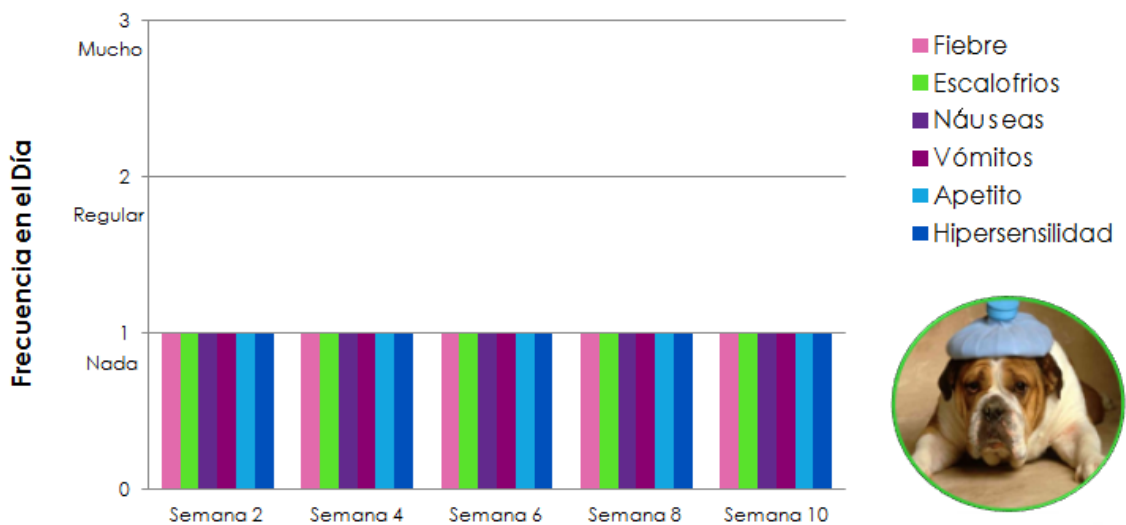


**Figura 17. Ensayo de fagocitosis con FITC-Dextran por citometría de flujo.** En el primer histograma se muestra el control de 0% de fagocitosis con RPMI 1640 a 37°C. El segundo histograma con FITC-Dextran a 37°C con 40.1% de fagocitosis. El tercer histograma con FITC-Dextran a 4°C con 7.3% de fagocitosis.

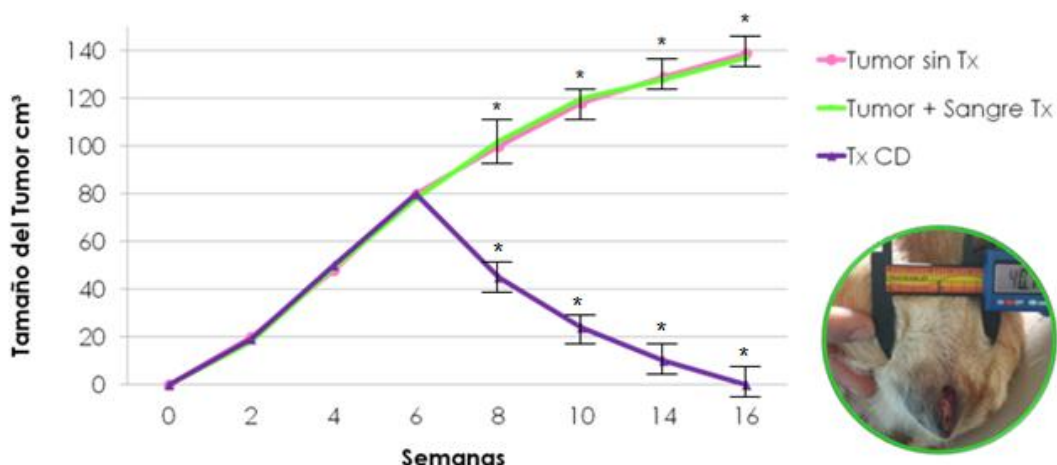
#### 7.5 Evaluación de la inmunoterapia autóloga con células dendríticas

Después de la aplicación de las vacunas no se observó ningún efecto secundario en nuestros pacientes (**Figura 18**). El tamaño se midió cada semana para ver el efecto de la terapia. Observamos como hubo una reducción significativa en la semana 8, 10, 12, 14 y 16 hasta llegar a no detectarse el tumor entre los perros vacunados con las CD. El tumor en los grupos controles creció continuamente hasta la semana 16 con un tamaño de aproximadamente 140 cm y se observó un cambio significativo de la regresión total del tumor en el grupo tratado con CD (**Figura19**). En la **Figura 20** se muestra una comparación de dos pacientes antes y después de la inmunoterapia autóloga con células

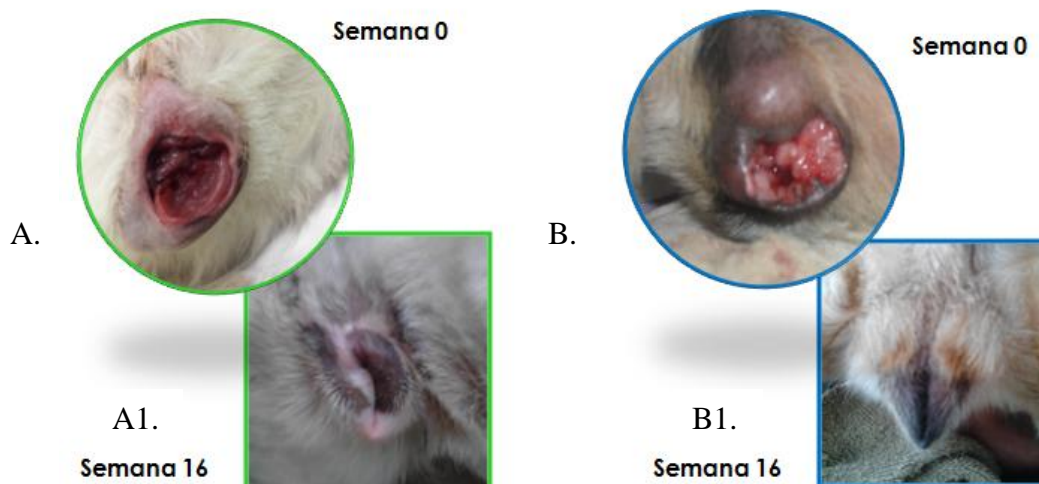
dendríticas específicas del tumor venéreo transmisible. Podemos apreciar como para el día 0 ambas pacientes muestran un tamaño tumoral de aproximadamente 3 cm, vemos como la vulva muestra una protuberancia tumoral, el tumor no deja que la vulva cierre y presenta una textura turgente. Sin embargo para la semana 16 podemos apreciar que ya no hay tumor, la vulva cierra bien, tiene su morfología normal y una textura blanda. También se muestra un caso representativo del grupo experimental que recibió la inmunoterapia autóloga con células dendríticas específicas del tumor venéreo transmisible. En este paciente podemos apreciar cómo fue disminuyendo el tumor durante la inmunoterapia, desde la semana 0 cuando el tumor presentaba un tamaño de 3cm, hasta la semana 16, donde ya no se parecía ningún tumor y la vulva tiene su forma y textura normal (**Figura 21**).



**Figura 18. Evaluación de los efectos secundarios de la inmunoterapia autóloga con células dendríticas.** Después de la administración de ciclos de tratamiento con terapia autóloga se evaluaron los diferentes efectos secundarios: fiebre, escalofríos, náuseas, vómitos, apetito e hipersensibilidad durante un lapso de 10 semanas.



**Figura 19. Evolución del tamaño tumoral durante la inmunoterapia.** Se determinó la evolución del tumor después de la inoculación de TVT intravaginal y los ciclos de tratamiento con terapia autóloga de CD y como control se empleó sangre total, durante un lapso de 16 semanas.



**Figura 20. Comparación de dos pacientes antes y después de la inmunoterapia autóloga con células dendríticas específicas del tumor venéreo transmisible.** Podemos apreciar como para el día 0 ambas pacientes muestran un tamaño tumoral de aproximadamente 3 cm, vemos como la vulva muestra una protuberancia tumoral, el tumor no deja que la vulva cierre y presenta una textura turgente. Sin embargo para la semana 16 podemos apreciar que ya no hay tumor, la vulva cierra bien, tiene su morfología normal y una textura blanda.

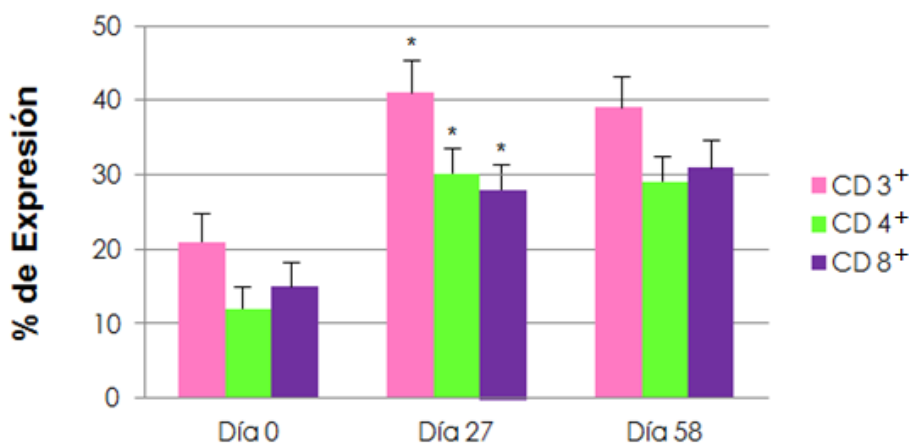


**Figura 21. Caso representativo del grupo experimental que recibió la inmunoterapia autóloga con células dendríticas específicas del tumor venéreo transmisible.** En este paciente podemos apreciar el efecto de regresión tumoral inducido por el tratamiento con terapia autóloga de CD desde la semana 0 cuando el tumor presentaba un tamaño de 3cm, hasta la semana 16, donde ya no se parecía ningún tumor, la vagina y vulva tienen su forma y textura normal.

## 7.6 Evaluación de las poblaciones de linfocitos en sangre periférica por citometría de flujo

Se evaluaron las poblaciones de linfocitos ( $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ) en sangre periférica por citometría de flujo en los días 0, 27 y 58 (**Figura 22**). En el día 0, antes de la terapia, se obtuvo una expresión celular de 22%, 13% y 15% respectivamente, en nuestro grupo que recibió la inmunoterapia, mientras que en los grupos controles se obtuvieron valores muy similares de 20%, 11% y 16% respectivamente, de expresión celular, en donde no se encontró una diferencia significativa ( $P>0.05$ ). Para el día 27 los poblaciones de linfocitos  $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  se expresaron en un 41%, 30% y 27% respectivamente en el grupo tratado con CD, mientras que en los controles hubo una expresión celular de 21%, 15% y 17% respectivamente, mostrando una diferencia significativa ( $P<0.05$ ). Para el día 58 se expresaron en un 38%, 28% y 32% respectivamente, mientras que en

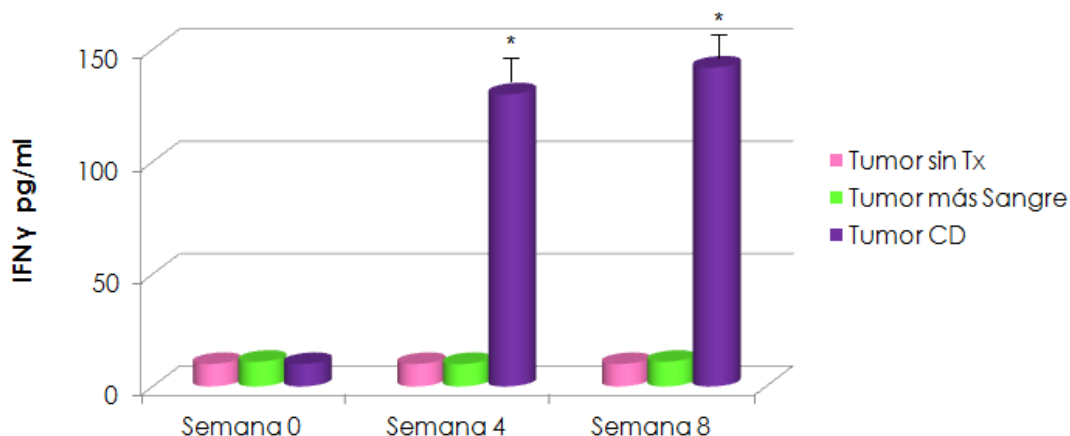
los controles la expresión celular fue de 22%, 14% y 14% respectivamente, de igual manera también se encontró una diferencia significativa ( $P<0.05$ ). Se mostró un incremento significativo tanto en las poblaciones de  $CD4^+$  y de  $CD8^+$  ( $P<0.05$ ) a los 27 y 58 días posterior a la terapia autóloga con CD comparado con los grupos controles.



**Figura 22. Evaluación de las poblaciones de linfocitos en sangre periférica por citometría de flujo.** Se determinaron los porcentajes de expresión fenotípica de los marcadores celulares de  $CD3^+$ ,  $CD4^+$  y  $CD8^+$  en los caninos tratados con terapia autóloga con CD los días 0, 27 y 56 después del tratamiento.

### 7.7 Determinación de los niveles $IFN-\gamma$ en sangre por ELISA

Para evaluar que los linfocitos T fueron activados por las CD decidimos determinar los niveles de  $IFN-\gamma$  (pg/mL) en el suero de los pacientes antes y después de la terapia mediante la técnica de ELISA. En la semana 0 se registraron niveles muy bajos de aproximadamente 10 pg/mL para todos los grupos experimentales, de igual manera en las semanas 4 y 8 en los grupos controles menos en el grupo con tratamiento con CD en el cual hubo un aumento significativo ( $p<0.05$ ) comparado con los controles. En la semana 4 se obtuvo 130 pg/mL y en la semana 8, 142 pg/mL. De esta manera corroboramos que si hubo una activación de los linfocitos citotóxicos, por la liberación del  $IFN-\gamma$  en el suero de los pacientes tratados con CD a diferencia de los grupos controles como se aprecia en la **Figura 23**.

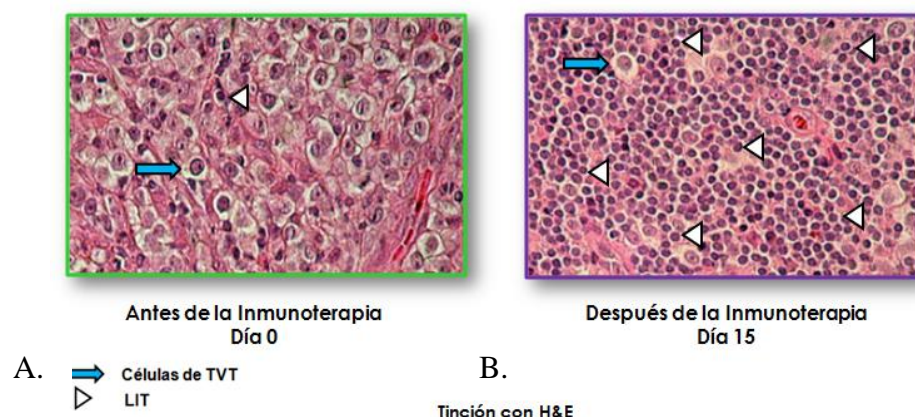


**Figura 23. Evaluación de sueros sanguíneos.** Los sueros caninos tratados con terapia autóloga de CD fueron evaluados mediante ELISA para determinar la producción de los niveles de IFN- $\gamma$  de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La diferencia estadística se determinó con una \*  $p < 0.05$ .

### 7.8 Evaluación de los cambios histológicos en el tumor durante la inmunoterapia con células dendríticas autólogas

Mediante la técnica de hematoxilina y eosina en el día 0, antes de realizar la terapia se pueden apreciar con la flecha azul la gran cantidad de células de TVT, grandes, redondas a ovoides, con un núcleo prominente, citoplasma vacuolado y con los triángulos blancos se muestran los LIT. Se observan aproximadamente 5 LIT por 52 células de TVT. Para el día 15 después de la primera terapia se puede apreciar la gran cantidad de LIT y pocas células de TVT, se observa aproximadamente una relación de 66 LIT por cada célula de TVT (**Figura 24**).

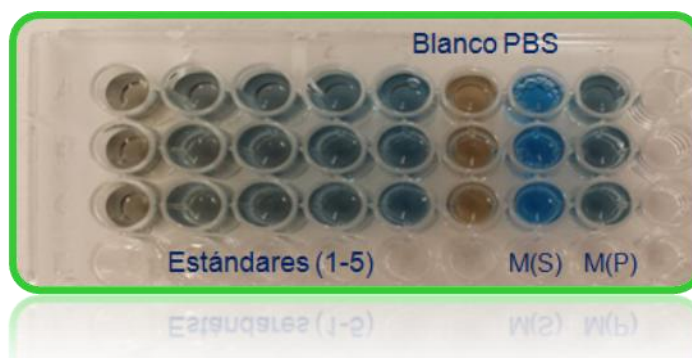




**Figura 24. Cambios histológicos antes y después de la inmunoterapia autóloga con células dendríticas.** A) En el corte con Hematoxilina y Eosina antes de la inmunoterapia podemos apreciar con la flecha azul la gran cantidad de células de TVT por sus características morfológicas, y con los triángulos blancos la poca cantidad de LIT. B) Después de la aplicación de la primera inmunoterapia, a los 15 días, podemos apreciar la gran cantidad de LIT en proporción con las células de TVT. Se observa aproximadamente una relación de 66 LIT por cada célula de TVT.

### 7.9 Evaluación de la capacidad inmunológica del extracto tumoral total del tumor venéreo transmisible como método de prevención *in vivo*.

Una vez terminadas las aplicaciones de las vacunas del ETT de TVT y retarlas al día 38 con  $1 \times 10^8$  células de TVT en la mucosa de la vagina se observaron las pacientes por seis meses y no se observó crecimiento tumoral ni efectos secundarios (**Figura 25 y 26**).



**Figura 25. Prueba de Bradford para el extracto tumoral total del tumor venéreo transmisible.** La prueba de Bradford determina la concentración de proteína de los antígenos del ETT de TVT. Se muestran los estándares del 1 al 5, luego el blanco con PBS como control y nuestra muestra (S) que tenía el sobrenadante y la muestra (P) en donde estaba el pellet.





**Figura 26. Evaluación de la capacidad inmunológica del extracto tumoral total del tumor venéreo transmisible como método de prevención *in vivo*.** En la primera figura se muestra como y donde se realizaron las aplicaciones del ETT. En la segunda, luego de las tres inmunizaciones se inocularon  $1 \times 10^8$  células de TVT en las paredes de la vulva. En la última semana se muestra como no hubo crecimiento del tumor luego de 6 meses de observación.

## 8. DISCUSIÓN

Tras el paso de los años uno de los grandes retos de la medicina ha sido el crear nuevos tratamientos para combatir el cáncer, que estos a su vez disminuyan el daño a las células sanas y los efectos secundarios de los pacientes tratados. La inmunoterapia es considerada como una terapia alternativa o adjunta para el tratamiento del mismo. Con el fin de visualizar esta terapia como una primera opción al igual que la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia en el presente estudio se determinó la efectividad de la inmunoterapia autóloga con células dendríticas en modelos caninos con tumor venéreo transmisible.

Por lo general los ratones son los animales comúnmente utilizados para las terapias de vacunas, sin embargo muchas veces los resultados no son aplicables en humanos. Buscando un modelo más similar a la genómica humana y con valores de referencia para la inmunoterapia más parecidos al humano se decidió utilizar a la especie canina. De igual manera, los perros desarrollan muchos tipos de cáncer similares a los humanos. Gracias a la peculiaridad del TVT en su forma de transmisión se estableció este modelo en todos nuestros pacientes experimentales. La interacción inmunológica entre las células tumorales y el hospedero se debe a la forma en que el TVT evade la respuesta inmune por la baja expresión en los niveles de CMH, IL-6, IFN- $\gamma$  y la inhibición de la función de las células presentadoras de antígeno. Chien *et al.* 2010 y Chung *et al.* 2009 demostraron de manera experimental que cuando el tumor se inocula en un lugar que no es su lugar de origen este tiene una fase de regresión. Ellos inocularon las células tumorales en el dorso de los perros y observaron como a los seis meses post la inoculación de las células el tumor tuvo una regresión espontánea. De manera contraria al área clínica cuando un perro es diagnosticado con TVT sino se le da tratamiento el tumor sigue creciendo pudiendo llegar hasta metástasis. Nosotros realizamos la inoculación en la vagina de las hembras (su órgano de origen) por vía submucosa y el tumor se desarrolló a los dos meses y tuvo un crecimiento muy similar a su evolución natural. Este se mantuvo hasta por seis meses sin mostrar ninguna regresión

En la actualidad se están estudiando las vacunas de CD para el tratamiento de tumores. Se utilizan diferentes protocolos para la diferenciación de los monocitos de sangre periférica a CD durante un periodo de siete a catorce días con diferentes estímulos. Nuestro protocolo fue de 48 horas con un coctel de citocinas y aplicándoles un adyuvante, KLH, para madurarlas más rápido. Una vez obtenidos los monocitos se les aplicó IL-4, GM-CSF y se incubó por 24 horas, luego se les administró el ETT de TVT, KLH, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , y PGE<sub>2</sub> hasta cumplir las 48 horas. Se observó un cambio morfológico y fenotípico en las células midiendo su expresión de CD 14<sup>+</sup>, CD 80<sup>+</sup>, CD 83<sup>+</sup> y DLA II antes y después de la diferenciación obteniendo unos valores proporcionales y favorables al protocolo. Además se probó la capacidad de fagocitosis de nuestras CD inmaduras mediante la técnica de FITC-Dextran. Las CD maduras diferenciadas en este estudio mostraron una excelente presentación de antígeno y a su vez un aumento en la proliferación de linfocitos T. Por lo tanto, se sugiere que las células dendríticas generadas presentan ser CPA capaces de activar linfocitos T. Trabajos anteriores en nuestro laboratorio demostraron que a las 24 horas de incubación con el GM-CSF e IL-4 las células dendríticas inmaduras tienen la capacidad de fagocitosis por lo cual en este periodo se pulso a dichas células con el extracto tumoral total para que este sea procesado, degradado y cargado en moléculas del CMH clase I y II para posteriormente llevar a cabo la activación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>, respectivamente (Olguín *et al* 2012).

La diferenciación morfológica y fenotípica fue la esperada en base a lo reportado por Chien-Chun *et al.* en el 2011. En donde se evalúa la diferenciación de monocitos a células dendríticas y donde podemos encontrar diferencias visuales debido a que en este trabajo se reporta un protocolo de estimulación de 5 días. Por otra parte el utilizado para este trabajo fue el protocolo reportado por Olguín en el 2012 en donde la diferenciación en un lapso de 48 horas demostró ser suficiente para que las células tuvieran capacidades fenotípicas y efectoras propias de una célula presentadora de antígeno. De esta forma se logró mejorar los tiempos de cultivo para nuestra terapia. Se confirmó la total maduración de las CD mediante una fenotipificación por citometría de flujo en donde los marcadores de linaje monocítico CD14<sup>+</sup> y DLA II muestran un patrón

de expresión consistente con la maduración celular observando que la expresión de CD14<sup>+</sup> se pierde tras la maduración y el DLA II aumenta y se homogeniza como se reporta en trabajos como los de Jarnjak-Jankovic *et al.* en el 2007 y de Bürdek *et al.* en el 2010.

Por su parte los marcadores de CD durante el proceso de diferenciación van aumentando la expresión de CD80<sup>+</sup> y CD83<sup>+</sup>. En la fenotipificación de monocitos presentan una expresión de 15.6% y 0.4% respectivamente. Luego de la finalización del proceso estos niveles aumentan significativamente, aproximadamente entre 80.3% y 76.4% respectivamente, resultados similares a los de Chien-Chun *et al.* en el 2011. Para ver que estas CD cumplieran su función de fagocitar realizamos una prueba de capacidad endocítica con FITC-Dextran, en donde se obtuvo un 40.1% de captación, lo que demuestra que las CD están diferenciadas y cumpliendo su función de célula presentadora de antígeno.

Una vez ya obtenidas nuestras CD inmaduras se cultivaron con nuestro ETT de TVT el cual tenía una concentración final de 300 µg/mL de extracto proteico. Observamos como estas células empezaron a presentar proyecciones y cambiaron su morfología similar a lo reportado por Chien-Chun *et al.* en el 2011. Una vez ya obtenidas nuestra CD maduras y presentando en su membrana el ETT de TVT comenzamos nuestra inmunoterapia. Todos nuestros pacientes tenían un volumen tumoral de aproximadamente 3 cm y se tomó el 4% de su peso corporal de sangre mediante una punción en la yugular. Se administraron tres vacunas de CD en intervalos de dos semanas por vía subcutánea cerca al nódulo linfático poplíteo. Las vacunas inhibieron el crecimiento del tumor exitosamente, mejoraron la inmunidad anti-tumoral, tanto la innata como la adaptativa. Podemos ver como esta inmunidad celular mediada por las CD específicas de TVT aumentaron los LIT, los linfocitos T citotóxicos (LTC) y la producción de IFN-γ. Los resultados demuestran que esta terapia muestra una habilidad para activar la respuesta inmune del huésped y además sugiere que el TVT es un buen modelo para evaluar el potencial de la inmunoterapia tumoral.

Uno de los criterios para la evaluación de la inmunoterapia fueron los efectos secundarios en las hembras, fiebre, escalofríos, náuseas, vómitos, inapetencia hipersensibilidad. Ningún paciente del grupo experimental mostró efectos secundarios, como ya se han reportado otros autores. Pero un canino tratado fuera del grupo experimental sufrió luego de dos semanas de la primera terapia una reacción de hipersensibilidad en su piel. Al evaluar el tamaño tumoral se observó como en los grupos controles el tumor creció hasta el final del estudio sin regresión alguna. A diferencia de otros autores como Chien y Chung, en donde hubo una regresión espontánea en el tumor cuando se inoculaba en el dorso de los perros. En el grupo tratado con CD autólogas específicas de TVT hubo una regresión completa a la semana número 8 y con una significancia de  $p < 0.05$  comparado con los grupos controles.

Además se evaluaron las poblaciones de linfocitos ( $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ) en sangre periférica por citometría de flujo en los días 0, 27 y 58. En el día 0, antes de la terapia, se obtuvo una expresión celular de 22%, 13% y 15%, respectivamente. Luego de la inmunoterapia si hubo un incremento en los porcentajes de expresión celular con una diferencia significativa de ( $p < 0.05$ ). Para el día 27 se expresó un 41%, 30% y 27% y para el día 58 un 38%, 28% y 32% respectivamente. Lo que nos indica que si hubo un aumento en las poblaciones de linfocitos luego de la terapia con CD autólogas. Es decir que nuestras CD si pudieron activar a los linfocitos vírgenes en el nódulo linfático y estos infiltrarse a su vez en el tumor como lo reportado con Yang *et al.* 2009.

Para evaluar que los linfocitos T fueron activados por las CD decidimos determinar los niveles de IFN- $\gamma$  (pg/mL) en el suero de los pacientes antes y después de la terapia mediante la técnica de ELISA. En la semana 0 se registraron niveles muy bajos de aproximadamente 10 pg/mL para todos los grupos experimentales, de igual manera en las semanas 4 y 8 en los grupos controles menos en el grupo con tratamiento con CD en el cual hubo un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) comparado con los controles. En la semana 4 se obtuvo 130 pg/mL y en la semana 8 se alcanzó 142 pg/mL. De esta manera corroboramos que si hubo una activación de los linfocitos citotóxicos, por la liberación

del IFN- $\gamma$  en el suero de los pacientes tratados con CD a diferencia de los grupos controles al igual que Chien *et al.* 2010.

Otro aspecto que se evaluó fueron los linfocitos infiltrantes de tumor LIT en las biopsias tumorales en las diferentes etapas de la inmunoterapia mediante histología. En las primeras biopsias pudimos observar las células tumorales muy organizadas, con su membrana intacta, redondas y su núcleo grande característico de las células de TVT y muy pocos LIT. Luego de la primera terapia a los 15 días empezamos a ver como esta organización se va rompiendo y empiezan a verse más LIT en la laminilla, aproximadamente se observa 60 linfocitos por cada célula de TVT. Se ven cambios en la morfología de las células tumorales, espacio intersticial y la gran población de los TIL. Lo que nos confirma que si hubo una respuesta inmunológica a nuestra inmunoterapia al movilizar una gran cantidad de LIT a la masa tumoral, además de la disminución en el tamaño, el aumento en la cantidad de linfocitos en sangre periférica y la producción de IFN- $\gamma$  en el suero de los pacientes. Obtuvimos resultados muy similares a los de Hsiao y colaboradores en el 2002, ellos inocularon las células de TVT en el dorso de los perros observando una regresión espontánea del tumor a las 36 semanas de la inoculación. Ellos aplicaron una inmunoterapia con células híbridas de CD y células de TVT y observaron que hubo una regresión a las 18 semanas. Esto pudiese ser debido a que como está en un lugar diferente pudiese crearse un microambiente poco favorable para el mantenimiento y progresión del tumor. Ellos encontraron que la regresión espontánea del tumor estaba correlacionada con la gran cantidad de linfocitos infiltrantes de tumor. Los cuales secretan IL-6 e IFN- $\gamma$  y están relacionadas con el aumento de expresión de las moléculas del CMH en las células tumorales. De esta manera el sistema inmune puede reconocer las células tumorales de manera específica.

En la evaluación de la capacidad inmunológica del extracto tumoral total de TVT como método de prevención *in vivo* se vacunaron a tres hembras. Se les aplicó tres vacunas en intervalos de dos semanas cada una por vía subcutánea. Luego de la última aplicación al siguiente día se retó a las pacientes con  $1 \times 10^6$  células de TVT inyectadas en la vulva subcutáneamente. Luego de esto observamos por 6 meses si se desarrollaba el

tumor pero no hubo crecimiento alguno del tumor durante ese periodo. Aun nos queda por analizar este ETT de TVT para ver que componentes tiene y crear alguna vacuna preventiva que se adapte en el esquema regular de la vacunación de las mascotas.

## 9. CONCLUSIONES

- Se estableció un cultivo primario de células de TVT viables durante un periodo de 10 días.
- Se logró implementar un protocolo de inoculación del TVT en un modelo canino en su órgano de blanco de manera experimental.
- Se diferenciaron monocitos de sangre periférica a células dendríticas autólogas *in vitro* específicas para TVT en 48 horas.
- Implementamos el modelo *in vivo* de la inmunoterapia autóloga con CD específicas para caninos con TVT.
- La inmunoterapia con CD autólogas incrementó significativamente las poblaciones de linfocitos T (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) en sangre periférica y además incrementó significativamente los niveles de IFN- $\gamma$  en suero.
- La inmunoterapia autóloga con CD no presentó ningún efecto secundario y hubo un incremento en la inmunidad celular.
- El ETT del TVT previene el crecimiento del TVT.
- La inmunoterapia autóloga con células dendríticas induce la regresión del TVT.



## 10. PERSPECTIVAS

- Esta investigación deja la pauta para futuros trabajos que podrían enfocarse en evaluar más a fondo la activación de la inmunidad adaptativa y la inmunidad innata.
- De igual manera el utilizar lisados de las células tumorales para estimular a las CD, ya que se ha demostrado su uso con resultados prometedores.
- Realizar la inmunoterapia en conjuntos con los linfocitos CD8<sup>+</sup> para ver si hay una disminución en el tumor a menor tiempo.
- El poder implementar esta terapia en humanos con diferentes tumores para evaluar la regresión tumoral.
- Identificar y caracterizar los antígenos tumorales del TVT.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

Ardavín Carlos, Sebastián Amigorena, Caetano Reis e Sousa. 2004. Dendritic cells: immunobiology and cancer immunotherapy. *Immunity*. 17-23.

Bergman PJ. 2010. Cancer immunotherapy *Vet Clin Small Anim*. 507–518.

Cheng-Chi Liu, Yu-Shan Wang, Ching-Yi Lin, Tien-Fu Chuang, Kuang-Wen Liao, Kwan-Hwa Chi, Mo-Fan Chen, Hsin-Chien Chiang, Rea-Min Chu. 2007. Transient downregulation of monocyte-derived dendritic-cell differentiation, function, and survival during tumoral progression and regression in an in vivo canine model of transmissible venereal tumor. *Cancer Immunol Immunother*. 479–491.

Chien-Chun Paia, Tzong-Fu Kuob, Simon J.T. Maoc, Tien-Fu Chuanga, Chen-Si Lina, Rea-Min Chua. 2011. Immunopathogenic behaviors of canine transmissible venereal tumor in dogs following an immunotherapy using dendritic/tumor cell hybrid. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 187–199.

Chun PC, Fu Kuob T, Simon JT. Fu Chuanga T, Lina CS, Chua RM. 2011. Immunopathogenic Behaviors of canine transmissible venereal tumor in dogs following an immunotherapy using dendritic/tumor cell hybrid. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 187–199.

Chung CP, Chuang TF, Rong TJ, Chan GH, Chun HY, Jon HL, Yin WC, Min RC. 2009. Effects of immunotherapy of Il-6 and Il-15 plasmids on transmissible venereal tumor in beagles. *Veterinary immunology and immunopathology*. 25–34.

Claudio Murgia, Jonathan K. Pritchard, Su Yeon Kim, Ariberto Fassati, Robin A. Weiss. 2006. Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. *Cell*. 477-487.

David Dingli, Martin A. Nowak. 2006. Cancer biology: infectious tumour cells. *Nature*. 35-41.

De La Sota P, Amigo G, Adagio L, Noia M, Gobello C. 2000. Tumor venéreo transmisible en el perro. *Ciencia veterinaria*. 1,515-1,883.

Emens LA, Jaffee EM. 2007. Immunotherapy and cancer therapeutics: Why partner? *Cancer immunotherapy*. 207-233.

EP Murchison. 2009. Clonally transmissible cancers in dogs and Tasmanian devils. *Oncogene*. 19-30.

Granados D, Delgado G. 2008. Células dendríticas (CDs) diferenciadas a partir de monocitos humanos como herramienta para el estudio de agentes antileishmaniales. *Ciencias biomédicas*. 101-236.

Gerold Schuler, Beatrice Schuler, Thurner, Ralph M Steinman. 2003. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Current Opinion in Immunology*. 138–147.

Harmelin A, Pinthus JH, Friedmann MD, Kaufman K, Brenner O. 2002. Lack of mhc expression and retention of ultrastructural characteristics by xenograft transmissible venereal tumor cells in scid mice. 245–249.

Havranek EG, Whelan MA, Greenhalgh R, Dalglish AG, Pandha H. 2002. Advances in prostate cancer immunotherapy. *Surgical oncology*. 35–45.

Hayes RL, Arbit E, Odaimi M, Pannullo S, Scheff R, Kravchinskiy D, Zaroulis C. 2001. Adoptive Cellular immunotherapy for the treatment of malignant gliomas. *critical reviews in oncology/hematology*. 31–42.

Huang YA, Hayes RL, Wertheim SD, Arbit E, Scheff RF. 2001. Treatment Of Refractory Recurrent Malignant glioma with adoptive cellular immunotherapy: a case report. *Critical reviews in oncology/hematology*. 17–23.

John R. Yannelli, Joanne M. Wroblewski. 2004. On the road to a tumor cell vaccine: 20 years of cellular immunotherapy. *Vaccine*. 97-113.

Kaminski JM, Summers JB, Ward MB, Huber MR, Minev B. 2003. Immunotherapy and prostate cancer. *Cancer treatment reviews*. 199–209.

Karolina Palucka, Jacques Banchereau. 2012. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature reviews cancer*. 265-277.

Kumar S, Mason M. 2012. Principles of cancer treatment by immunotherapy. *Surgery*. 198-202.

López M, Escobar A, Alfaro J, Fodor M, Larrondo M, Ferrada C, Salazar-Onfray F. 2004. Advances in cellular immunotherapy for malignant melanoma. *Revista médica Chile*. 1,115-1,126.

Marchal T, Chabanne L, Kaplanski C, Rigal D, Magnol JP. 1997. Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumour. *Veterinary immunology and immunopathology*. 1-11.

Mclaughlin MJ, Kroesen BJ, Harmsen MC, Leij LF. 2001. Cancer immunotherapy: insights from transgenic animal models. *Critical reviews in oncology/hematology*. 53–76.

Meza JJ, Montano LA, Aguayo GA. 2006. Molecular basis of cáncer. *Rev. invest. Clín*. 56-70.

Mukaratirwaa AS, Gruys E. 2003. Canine transmissible venereal tumour: cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology. *Veterinary quarterly*. 101-111.

Pérez J, Day MJ, Mozos E. 1998. Immunohistochemical study of the local inflammatory infiltrate in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of grow. 133–147.

Ramírez RR, García JS, Nevárez GA, Rodríguez TL. 2010. Transmissible venereal tumor with metastasis to a spleen hemangioma in a bitch. Vet. Méx. 21-30.

Rescigno M, Avogadri F, Curigliano G. 2007. Challenges and prospects of immunotherapy as cancer treatment. Biochimica et biophysica acta. 108–123.

Rosenblatt J. 2008. Cellular immunotherapy for multiple myeloma. Best practice & research clinical haematology. 559–577.

Ross DS, Steele G. 1984. Experimental models in cancer immunotherapy. Journal of surgical research. 15-430.

Sagrario Martín-Aragón, Paloma Bermejo-Bescós. 2011. Inmunoterapia y tratamiento oncológico. Ámbito farmacéutico. 53-58.

Sarah Seton-Rogers. 2012. Dendritic cell switch. Nature review cancer. Vol 12, April.

Sondei PM, Hank JA, Kohler PC, Sosman JA, Hillman GW, Fisch P. 1989. The cellular immunotherapy of cancer: current and potential uses of interleukin-2. 23-38.

Ya-Wen Hsiao, Kuang-Wen Liao, Shao-Wen Hung, Rea-Min Chu. 2002. Effect of tumor infiltrating lymphocytes on the expression of MHC molecules in canine transmissible venereal tumor cells. Veterinary Immunology and immunopathology. 19-27.

Young P, Chang K, Jung H, Seong T, Sung GK, Tai GK. 2007. The optimal interval for dendritic cell vaccination following adoptive T cell transfer is important for boosting potent anti-tumor immunity. Vaccine 322–333.

## **12. RESUMEN BIOGRÁFICO**

**Yareellys Ramos Zayas**

Candidata para el Grado de

**Maestra en Ciencias con Acentuación en Inmunobiología**

**Tesis:** INMUNOTERAPIA AUTÓLOGA CON CÉLULAS DENDRÍTICAS EN  
MODELOS CANINOS CON TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE

**Campo de Estudio:** Inmunobiología del Cáncer

**Datos Personales:** Nacida en San Juan, Puerto Rico, el 26 de Diciembre de 1979, hija de Wanda Zayas López y Armando Ramos Negrón.

**Educación:** Egresada de la Universidad de Puerto Rico, Recinto de Cayey, grado obtenido de Bióloga en 2004. Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Médico Veterinario y Zootecnista en 2012, estudiante talento durante toda mi licenciatura, con mención honorífica y merito académico por primer lugar de generación 2007-2012.

**Experiencia Profesional:** Médico Veterinario y Zootecnista en México y Puerto Rico desde 2012, Asistente de Cirugía en la FMVZ, UANL desde 2010 y Asistente Veterinario en Puerto Rico desde 2005.